

**APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO DE LOS EFECTOS FISIOLÓGICOS
MORFOLÓGICOS Y NUTRICIONALES DEL ESTRÉS POR COBRE
EN PLANTAS DE ALTRAMUZ Y SOJA**

TESIS DOCTORAL
BEATRIZ SÁNCHEZ-PARDO RODRÍGUEZ
MADRID 2010



TESIS DOCTORAL

APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO DE LOS EFECTOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS Y NUTRICIONALES DEL ESTRÉS POR COBRE EN PLANTAS DE ALTRAMUZ Y SOJA

BEATRIZ SÁNCHEZ-PARDO RODRÍGUEZ

MADRID, 2011



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Agrícola

Aportación al conocimiento de los efectos fisiológicos,
morfológicos y nutricionales del estrés por cobre en plantas de
altramuz y soja

Memoria que presenta Beatriz Sánchez-Pardo Rodríguez
para aspirar al Título de Doctor en Ciencias Químicas

Vº Bº

Fdo.: Beatriz Sánchez-Pardo

DIRECTORA

Fdo.: Pilar Zornoza Soto

Profesora Titular

Universidad Autónoma de Madrid



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Agrícola

D. Ramón Carpena Ruiz, Director del Departamento de Química Agrícola de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada "Aportación al conocimiento de los efectos fisiológicos, morfológicos y nutricionales del estrés por cobre en plantas de altramuz y soja" y presentada por la licenciada Dña. Beatriz Sánchez-Pardo Rodríguez para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, ha sido realizada en el Departamento de Química Agrícola bajo la dirección de la Dra. Pilar Zornoza Soto

Y para así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid, a 1 de junio de dos mil once

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por varios proyectos de investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación (CTM2004-06715-CO2-01/TECNO, CTM2007-66401-CO2-02/TECNO y CTM2010-21922-CO2-02/TECNO), así como, por la Consejería de Educación de la Comunidad Autónoma de Madrid. Programa de actividades de I+D entre grupos de investigación (EIADES) Proyecto nº S2009/AMB-1478. Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral y los procedentes de trabajos realizados en el marco de los proyectos mencionados, se han publicado en revistas internacionales (ISI), forman parte de capítulos de libros o se han presentado en congresos y reuniones científicas.

Artículos:

Vázquez S, Fernández-Pascual M, **Sánchez-Pardo B**, Carpena R, Zornoza P. Subcellular compartmentalisation of cadmium in white lupins determined by energy-dispersive X-ray microanalysis. *Journal of Plant Physiology* 164 (2007) 1235-1238.

Zornoza P, **Sánchez-Pardo B**, Carpena RO. (2010). Interaction and accumulation of manganese and cadmium in the manganese accumulator *Lupinus albus*. *Journal of Plant Physiology* 167 (2010) 1027–1032.

Sánchez-Pardo B, Zornoza P. Differences in copper net uptake kinetics and response to copper stress in white lupin and soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* (PLAPHY-D-10-00099) En revision.

Capítulos de libro:

Zornoza P, Redondo MJ, Gil A, **Sánchez-Pardo B**, Carpena-Ruiz RO. Comportamiento de dos variedades de altramuz frente al cadmio. Interacción con nutrientes. En: *Nutrição Mineral: causas e consequências da dependência da fertilização*” (M. Amélia Martins-Loução, C. Cruz eds.). ISBN: 972-9348-11-1, pp. 409-414. (2004).

Sánchez-Pardo B, Carpena R, Zornoza P. Respuestas de toxicidad y tolerancia de la planta de altramuz a dosis elevadas de Mn, Cu, Zn y Cd. En: *Presente y Futuro de la Nutrición Mineral de las Plantas*”, (Romero Monreal L, Ruiz JM, eds.). ISBN: 978-84-89780-10-7, pp. 583-592, (2008).

Zornoza P, **Sánchez-Pardo B**. Índices de acumulación y transporte de Mn, Cu, Zn, Cd y Hg en plantas de altramuz. En: Aspectos Fisiológicos, Agronómicos y Ambientales en la Nutrición Mineral de las Plantas. (Estavillo JM, Becerril JM, Duñabeita MK, González MB, González MC, Hernández A, Lacuesta MT, Mena A, Muñoz A, Ortega U, eds.). ISBN: 978-84-614-3065-9, pp. 257-262, (2010).

Congresos y reuniones científicas:

Carpena Ruiz R, **Sánchez-Pardo B**, Peñalosa Olivares JM. Motivando en Química agrícola. Experiencia piloto con alumnos de primer ciclo de Química. Jornadas Nacionales de Intercambio de Experiencias Pilotos de Implantación de Metodologías ECTS. Aplicaciones prácticas de la Convergencia Europea. 13-15 Septiembre 2006, Badajoz, España.

Sánchez-Pardo B, Carpena R, Zornoza P. Respuesta del altramuz a dosis elevadas de cobre. Desequilibrios e interacción con nutrientes. XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal - X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal". 18-21 Septiembre de 2007, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Zornoza P, Millán R, Rodríguez C, Blanco P, **Sánchez-Pardo B**, Esteban E. Differences in accumulation and physiological response to mercury in white lupin, chickpea and spring wheat plants. 10th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements. 13-18 Julio de 2009, Chihuahua, México.

Sánchez-Pardo B, Zornoza P. Ecotoxicity and bioaccumulation of copper in white lupin and soybean plants: Interspecific differences. 20th Europe Annual Meeting, Science and Technology for Environmental Protection". 23-27 Mayo de 2010, Sevilla, España.

Sánchez-Pardo B, Carpena R, Zornoza P. Localisation of Cu and Fe in nodules of Cu-stressed soybean plants determined by energy-dispersive X-ray microanalysis. XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. 15-18 Junio de 2010, Zaragoza, España.

Agradecimientos:

Después de todos estos años, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que tanto de forma directa como indirecta han contribuido a que se lleve a cabo esta Tesis Doctoral.

En primer lugar a agradecer a mi directora de tesis, Pilar Zornoza Soto, por la confianza que ha depositado en mí y por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación, así como por su gran ayuda, esfuerzo, dedicación, paciencia y apoyo constante. Ha sido un auténtico placer trabajar a su lado.

Al Dr. Ramón Carpena, por darme la oportunidad de realizar esta Tesis, por su confianza y apoyo mostrado en todo momento. Al Dr. Jesús Peñalosa por volverme a dar la oportunidad de seguirme formando y trabajando en el ámbito de la fitorremediación y los metales pesados. Así como al resto de integrantes del Grupo de investigación “C-129 Metales Pesados en Plantas de la UAM”, Elvira, Eduardo y especialmente a Teresa y Rebeca, a quienes he tenido la oportunidad de conocer un poquito más y con las que he compartido buenos momentos en congresos y en el laboratorio.

A los Dres. César Arrese-Igor y a. Esther González pertenecientes al Centro de Ciencias del Medio Natural de la UPNA, por permitirme trabajar en su laboratorio y aprender nuevas técnicas. Quiero también agradecer su ayuda y colaboración al resto de los miembros del laboratorio, a Arantzazu, Estíbaliz y Joseba, que hicieron que mi estancia fuera muy agradable.

*A la Dra. Mercedes Fernández-Pascual del Instituto de Ciencias Agrarias del CSIC, por habernos cedido la cepa bacteriana *Bradyrhizobium* sp (Lupinus). Asimismo, por su colaboración, dedicación y asesoramiento con la microscopía y la estructura del nódulo, como por los buenos consejos que me ha dado durante todo este tiempo. También a César y a Susana por su inestimable ayuda y el cariño con el que me han tratado.*

A Fernando Pinto técnico del servicio de microscopía electrónica del CSIC por su experta contribución, sugerencias e ideas, por aportar su arte y diseñar la portada.

*Al Dr. Francisco Temprano del Centro de Investigación y Formación Agraria “Las Torres y Tomejil” (IFAPA, Junta de Andalucía) por habernos proporcionado la cepa bacteriana de *Bradyrhizobium japonicum* y las semillas de soja.*

Al Dr. Pedro del Castillo de la Facultad de Biología de la UAM por haberme ilustrado y ayudado en lo que respecta a la anatomía vegetal, al Dr. José Luis Sanz del Departamento de Biología Molecular de la UAM por su disposición y ayuda, así como al Dr. Luis Eduardo por haberme contestado a todas mis dudas sobre el fraccionamiento subcelular.

A Rosa Esteban, M^a Ángeles Martín, Esperanza Mollá, Francisco López Andréu y Enrique Eymar, por todo el cariño que me han mostrado durante todos estos años y por estar ahí en los momentos más difíciles.

De manera especial quiero agradecer a Vanesa Benítez, Vanesa Martín y Yolanda Aguilera, su apoyo, compañerismo y amistad. Con ellas he compartido risas, alegrías, penas, complicidades. Gracias por los buenos momentos vividos, tanto fuera como dentro del laboratorio. Sin ellas las cosas hubieran sido mucho más difíciles.

A Nadia y María por ayudarme siempre que las he necesitado, así como al resto de compañeros por haberme prestado su tiempo y ayudado en algún momento con sus conocimientos.

Al resto de personas que integran el Departamento de Química Agrícola de esta Universidad, por su simpatía y disponibilidad siempre que me ha hecho falta.

A Virginia Ramos, a quien conocí como comercial de laboratorio y al final acabó siendo una confidente. Gracias por la preocupación mostrada hacia mí cuando me has visto mal, por las largas y maravillosas conversaciones, los buenos consejos y sobre todo por el apoyo mostrado durante todo este tiempo.

A mis padres y hermano por su tremenda paciencia, su interés, comprensión, ánimos constantes, por su apoyo incondicional y por haber contribuido a lo largo de mi vida a ser quien soy.

A Dani, por su amor y cariño. Asimismo, por la comprensión, ayuda y paciencia infinita mostradas durante todos estos años sin las cuales no habría sido capaz de concluir este trabajo. Este esfuerzo también es suyo.

A mis abuelos, Paula, Crescencio, Carmen y José, este último ha sido una persona muy importante en mi vida y quién me despertó el interés por la agricultura y el medio ambiente.

A José, Conchi, Merche, Manolo, Juliana, así como a todos mis amigos (Silvia, Esther, Luz, Carol, Raquel, Gabriel, Pepe, Alberto, Natalia, Adrián, Tamara, Víctor, Adolfo, Eli, Guida, Bea, David, Miguel, etc.) y familiares que se han interesado por mí y por el desarrollo de esta Tesis.

A mi sobrino Iván, quien me arranca la mejor de mis sonrisas y me hace pasar momentos inolvidables.

Finalmente a los proyectos de investigación arriba mencionados sin los cuales no se hubiese posible llevarse a cabo.

A todos, GRACIAS

A mis padres

A mi hermano

A Dani

Índice

Contenidos**Pág.**

ABREVIATURAS.....	3
-------------------	---

INTRODUCCIÓN.....	9
-------------------	---

1. 1. Implicación del Cu en el crecimiento y nutrición de las plantas

1.1. Características físico-químicas y esencialidad del Cu.....	9
1.2. Origen y contenido de Cu en el suelo.....	11
1.3. Distribución y concentración de Cu en suelos españoles.....	18
1.4. Dinámica de Cu en el sistema suelo-planta.....	20
1.5. Biodisponibilidad de Cu en el suelo.....	23
1.6. Absorción y transporte de Cu en las plantas.....	25
1.7. Contenido y distribución de Cu en los distintos órganos de la planta.....	31
1.8. Funciones del Cu en la planta.....	32
1.9. Deficiencia de Cu.....	35
1.10. Toxicidad de Cu.....	37
1.11. Mecanismos de tolerancia de las plantas a dosis elevadas de Cu.....	40

2. Leguminosas de grano**2.1. Altramuz**

2.1.1. Origen y antecedentes históricos.....	44
2.1.2. Cultivo y producción del altramuz.....	45
2.1.3. Botánica y fisiología del altramuz.....	48
2.1.4. Exigencias ambientales.....	52
2.1.5. Técnicas de cultivo.....	53
2.1.6. Plagas y enfermedades.....	54
2.1.7. Características nutricionales.....	55

2.2. Soja

2.2.1. Origen y antecedentes históricos.....	57
2.2.2. Cultivo y producción de soja.....	58
2.2.3. Botánica y fisiología de la soja.....	60

Pág.

2.2.4. Exigencias ambientales.....	66
2.2.5. Técnicas de cultivo.....	67
2.2.6. Plagas y enfermedades.....	68
2.2.7. Características nutricionales.....	70
3. Fijación de nitrógeno por la simbiosis <i>Rizobium</i>-leguminosa	
3.1. Generalidades.....	71
3.2. Nodulación.....	73
3.2.1. Rizobios.....	73
3.2.2. Multiplicación y colonización.....	75
3.2.3. Adhesión a la raíz y proceso de infección.....	76
3.2.4. Inicio, desarrollo de los nódulos y regulación de la nodulación.....	78
3.3. Tipos de nódulos.....	79
3.4. Estructura de los nódulos de altramuza y soja.....	81
3.5. Fisiología del nódulo.....	82
3.6. Metabolismo nodular.....	85
3.6.1. Metabolismo del carbono.....	85
3.6.2. Asimilación de N en la fracción vegetal de los nódulos.....	86
OBJETIVOS.....	91
MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
1. Especies Vegetales.....	95
2. Microorganismos.....	96
3. Cámara de cultivo.....	96
4. Semilleros y transplante.....	97
5. Sistema de cultivo.....	99
5.1. Hidroponía pura o sin sustrato.....	99
5.2. Hidroponía con sustrato.....	101

6. Sistema de cultivo-Experimentos realizados.....	102
6.1. Cinéticas de absorción por raíces aisladas de altramuz y soja.....	102
6.2. Cinéticas de absorción de Cu a medio plazo y respuestas de estrés.....	104
6.3. Experimentos dosis-respuesta: Ecotoxicidad y bioacumulación de Cu.....	105
6.4. Experimentos de normalidad y exceso de Cu - Alteraciones morfológicas, estructurales y fisiológicas.....	106
6.5. Experimentos normalidad y exceso de Cu - Fraccionamiento y localización subcelular.....	108
6.6. Experimentos dosis-respuesta: Simbiosis <i>Rizobium</i> -Leguminosa.....	109
6.7. Comparación de experimentos con y sin fijación de N ₂	110
7. Métodos analíticos y técnicas instrumentales.....	111
7. 1. Análisis mineral.....	111
7.2. Adsorción/desorción de Cu por el sustrato de cultivo.....	111
7.3. Fraccionamiento subcelular.....	112
7.4. Espectrofotometría de absorción atómica.....	113
7.5. Análisis químico elemental.....	115
7.6. Indicadores de estrés.....	115
7.7. Determinación de proteínas solubles y actividades enzimáticas.....	118
7.8. Microscopía óptica y electrónica de transmisión.....	124
7.9. Microscopía electrónica de barrido a baja temperatura.....	126
8. Cálculos y métodos estadísticos.....	127
8.1. Cálculos.....	127
8.2. Métodos estadísticos.....	131
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	135
Capítulo I. Cinéticas de absorción de Cu por raíces aisladas de altramuz y soja	
1. Resultados.....	137
1.1. Método de lavado para desorber Cu.....	137

1.2. Absorción de Cu en función de la temperatura y de la concentración externa de Cu.....	137
1.3. Efecto del Zn sobre la absorción de Cu.....	139
1.4. Efecto del Mn sobre la absorción de Cu.....	141
1.5. Efecto del Cd sobre la absorción de Cu.....	143
1.6. Efecto del Cu sobre la absorción de Zn, Mn y Cd.....	144
2. Discusión.....	146

Capítulo II. Cinéticas de absorción de Cu a medio plazo y respuesta al estrés por Cu en plantas de altramuz y soja

1. Resultados.....	159
1.1. Cinéticas de acumulación de Cu.....	159
1.2. Síntomas visuales y crecimiento de plantas de altramuz y soja.....	160
1.3. Indicadores de estrés.....	161
2. Discusión.....	163

Capítulo III. Ecotoxicidad y bioacumulación de Cu en plantas de altramuz y soja

1. Resultados.....	171
1.1. Absorción neta, acumulación y transporte de Cu	171
1.2. Síntomas visuales y efecto del Cu sobre el crecimiento.....	174
1.3. Índices de absorción y acumulación de Fe, Mn y Zn en función de la dosis de Cu.....	177
1.4. Efecto del exceso de Cu sobre la concentración de MDA y –SH.....	180
2. Discusión.....	183

Capítulo IV. Alteraciones morfológicas, estructurales y fisiológicas producidas por el exceso de Cu en plantas de altramuz y soja

1. Resultados.....	195
1.1. Índices morfológicos de desarrollo foliar.....	195
1.2. Estructura de la hoja.....	197
1.3. Índices fisiológicos foliares.....	200

	<u>Pág.</u>
1.4. Índices morfológicos de desarrollo radicular.....	201
1.5. Estructura de la raíz.....	203
1.6. Efecto del exceso de Cu sobre la concentración de nutrientes.....	205
2. Discusión.....	208

Capítulo V. Resultados de fraccionamiento y localización subcelular de nutrientes en plantas de altramuz y soja

1. Resultados.....	217
1.1. Concentración y distribución subcelular de Cu.....	217
1.2. Concentración y distribución subcelular de Fe.....	223
1.3. Concentración y distribución subcelular de Mn.....	226
1.4. Concentración y distribución subcelular de Zn.....	229
1.5. Concentración y distribución subcelular de K.....	232
1.6. Concentración y distribución subcelular de Ca.....	235
1.7. Concentración y distribución subcelular de Mg.....	235
1.8. Microlocalización de Cu en hojas y raíces.....	238
1.9. Microlocalización de Fe, Zn, Ni, P, K y Mg en hojas y raíces.....	243
2. Discusión.....	252

Capítulo VI. Efecto del Cu sobre el desarrollo y funcionamiento de plantas noduladas de altramuz y soja

1. Resultados.....	263
1.1. Cobre retenido por el sustrato de cultivo.....	263
1.2. Parámetros relacionados con la nodulación y fijación de N ₂	264
1.3. Concentración total y microlocalización de Cu en nódulos de altramuz y soja...265	265
1.4. Estructura y ultraestructura del nódulo.....	268
1.5. Actividades enzimáticas del metabolismo de N y C en nódulos.....	277
1.6. Crecimiento y concentración de Cu en las plantas huésped.....	278
1.7. Estructura y ultraestructura de las hojas	280
1.8. Concentración y distribución de Fe, Mn, Zn y Ni en planta y nódulo.....	287

Pág.

2. Discusión.....	289
-------------------	-----

**Capítulo VII. estudio comparativo entre fijación y no fijación de N₂: Respuestas de
altramuz y soja frente al exceso de Cu**

1. Resultados.....	301
1.1. Absorción, acumulación y translocación de Cu.....	301
1.2. Tasas de crecimiento relativo	303
1.3. Exportación de N y concentración de proteínas.....	303
1.4. Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del N.....	306
1.5. Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del C.....	308
1.6. Indicadores de estrés.....	311
2. Discusión.....	312

CONSIDERACIONES FINALES.....	321
------------------------------	-----

CONCLUSIONES.....	333
-------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA.....	337
-------------------	-----

APÉNDICE.....	359
---------------	-----

Abreviaturas

AA	Absorción atómica
AAT	Aspartato aminotransferasa
atm	Atmósferas
b	Bacteroides
BAF	Factor de bioacumulación
BL	Boundary layer
c	Corteza
C.I.C.	Capacidad de intercambio catiónico
CC	Cilindro central
CE	Corteza externa
CEI	Comunidad de Estados Independientes
ci	Centro de infección
CI	Córtex interno
CTC _{10%}	Capacidad tóxica crítica que produce la reducción del un 10% del crecimiento
CTR	Copper transporter
CuZnSODs	Cuprozinc superóxido dismutasas
d	Vacuola digestiva
e ⁻	Electrones
E	Estoma
E.T.	Error típico
EC ₅₀	Concentración efectiva de un elemento que reduce el crecimiento en un 50%
ed	Endodermos
EDXMA	Microanálisis por dispersión de RX
EI	Epidermis inferior
ep	Epidermis
ES	Epidermis superior
ESC	Esclereidas
FAO	Food and Agriculture Organization
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
FRD3	<i>Ferric reductase defective 3</i>
GA	Gránulo de almidón
GOGAT	NADH-glutamato sintasa

GS	Glutamina sintetasa
GSH	Glutation
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Ha	Hectárea
HI	Hojas inferiores
HS	Hojas superiores
HV	Haz vascular
IA	Invertasa alcalina
IC	Inhibición del crecimiento
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
ICF	Índice de la capacidad fotosintética
it	Hilo de infección
ITP	<i>Iron transport protein</i>
LA	Área foliar
LAR	Proporción de área foliar
Lb	Leghemoglobina
LMR	Cantidad de peso seco localizado en las hojas
LR	Longitud de la raíz
LT	Espesor de la hoja
LTSEM	Microscopía electrónica de barrido a baja temperatura
m.o.	Materia orgánica
MATE	<i>Multidrug and toxin efflux</i>
MDA	Malondialdehído
MDH	Malato deshidrogenasa
MF	Materia seca
MP	Metal pesado
MS	Materia seca
MTs	Metalotioneinas
n	Núcleo del pelo radical
N ₂	Nitrógeno gas
NA	Nicotiamina
NAR	Tasa de asimilación neta
Nasa	Nitrogenada
NH	Número de hojas

$O_2^{\cdot -}$	Radical superóxido
O_2^{2-}	Anión peróxido
ODEPA	Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias
OH^{\cdot}	Radical hidroxilo
pb	Membrana peritobacteroidal
PCs	Fitoquelatinas
Pe	Parénquima en empalizada
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
phb	Gránulos de poli-hidroxibutarato
PI	Parénquima lagunar
r	Pelo radical
R	Rizodermis
r_0	Radio de la raíz
RA	Área radicular
RD	Real decreto
rh	Rizobio
rit	Ramificación del pelo radicular
RGR	Tasa de crecimiento relativo
RMR	Proporción peso seco localizado en las raíces
ROS	Especie reactiva de oxígeno
s	Simbiosoma
-SH	Tioles
SLA	Área foliar específica
SNF	Fijación específica de nitrógeno
SS	Sacarosa sintasa
t	Toneladas
T^a	Temperatura
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TP	Tricoma peltado
UDPGPPasa	UDP-glucosa pirofosforilasa
ZD	Zona de distribución
ZI	Zona infectada
ZIP	<i>ZRT/IRT-related proteína</i>

A black and white photograph of a textured surface, possibly leather or stone, with a diagonal line and a small circular object.

Introducción

1.- Implicación del Cu en el crecimiento y la nutrición de las plantas

1.1. Características físico-químicas y esencialidad del Cu

El cobre nativo es el primer metal usado por el hombre y fue descubierto por Ivo Bernal en el año 1730 en Fraybentos, aunque ya era conocido por algunas de las más antiguas civilizaciones. Es un metal rojizo y de brillo metálico, que presenta una conductividad eléctrica y térmica muy alta. No es magnético y es un importante metal no ferroso. Tiene un punto de fusión de 1083°C y una densidad de 8,96 g cm⁻³ a 20°C.

El cobre uno de los metales de transición, de símbolo Cu, con número atómico 29. Es el primer elemento del subgrupo IB de la tabla periódica, junto con la plata y oro (Fig. 1.1). El Cu tiene escasa relación con los elementos principales del grupo I y es notablemente diferente a la plata y el oro. Su átomo tiene la estructura electrónica 1s²2s²2p⁶3s²3p⁶3d¹⁰4s¹. El peso atómico del Cu es 63,54; tiene dos isótopos naturales estables (⁶³Cu y ⁶⁵Cu) y se conocen nueve isótopos radiactivos. Se caracteriza por su baja actividad química, combinándose químicamente en alguno de sus posibles estados de valencia; la más común es 2+, pero 1+ es también frecuente, mientras que la valencia 3+ ocurre sólo en unos cuantos compuestos inestables (Tabla 1.1).

El efecto biológico de los metales pesados (MP) depende de su capacidad iónica para formar complejos estables con los componentes orgánicos de la materia viva (Woolhouse, 1983). Los cationes de la serie de elementos d, como el Cu, presentan alta afinidad para formar complejos de coordinación. Debido a su elevada afinidad electrónica, los cationes mono- y divalentes de Cu, son los iones más efectivos para la unión a moléculas orgánicas. La geometría, la estequiometría y la estabilidad de los centros de coordinación en las moléculas orgánicas, depende de la naturaleza de los ligandos y del estado de oxidación del metal. En el estado de oxidación +1 (ión cuproso; Cu⁺) tiene todos los orbitales d ocupados, por tanto es diamagnético, y los números de coordinación más habituales son 2, 3 y 4 con geometría tetraédrica o trigonal. En el estado de oxidación +2 (ión cúprico; Cu²⁺) posee un electrón desapareado en el orbital d, por tanto es paramagnético y los

números de coordinación más habituales son 4, 5 y 6 con geometría cuadrada plana (Bernal, 2006). El Cu se encuentra dentro de los iones de clase frontera o “borderline”, los cuales poseen valores de índice de covalencia intermedios y una gran capacidad de unirse a una amplia gama de ligandos, incluyendo los donadores de oxígeno y los preferidos por los iones de la clase B (Fig. 1.1). Lindsay (1974), encontró que el Cu forma quelatos con la materia orgánica (m.o.), uniéndose coordinativamente al O, N, S, con el orden de preferencia siguiente $S > N > O$.

Tabla 1.1. Propiedades físico-químicas del Cu

Propiedades físico-químicas	Cu
Número atómico	29
Valencia	1,2
Estado de oxidación	+2
Electronegatividad	1,9
Radio covalente (Å)	1,38
Radio iónico (Å)	0,69
Radio atómico (Å)	1,28
Configuración electrónica	[Ar]3d ¹⁰ 4s ¹
Primer potencial de ionización (eV)	7,77
Masa atómica (g mol ⁻¹)	63,54
Densidad (g cm ⁻³)	8,96

El Cu es un elemento esencial para los seres humanos, animales y plantas. La esencialidad para la vida vegetal fue demostrada por Sommer en 1931. Participa en numerosos procesos fisiológicos y es un cofactor esencial de muchas metaloenzimas. Además, está involucrado en el balance de bioelementos que, en la planta, regulan la transpiración, interviene en la formación de la clorofila y en el transporte de electrones durante la fotosíntesis y respiración, así como, en la formación de lignina, proteínas y en el metabolismo de carbohidratos (Marschner, 1995).

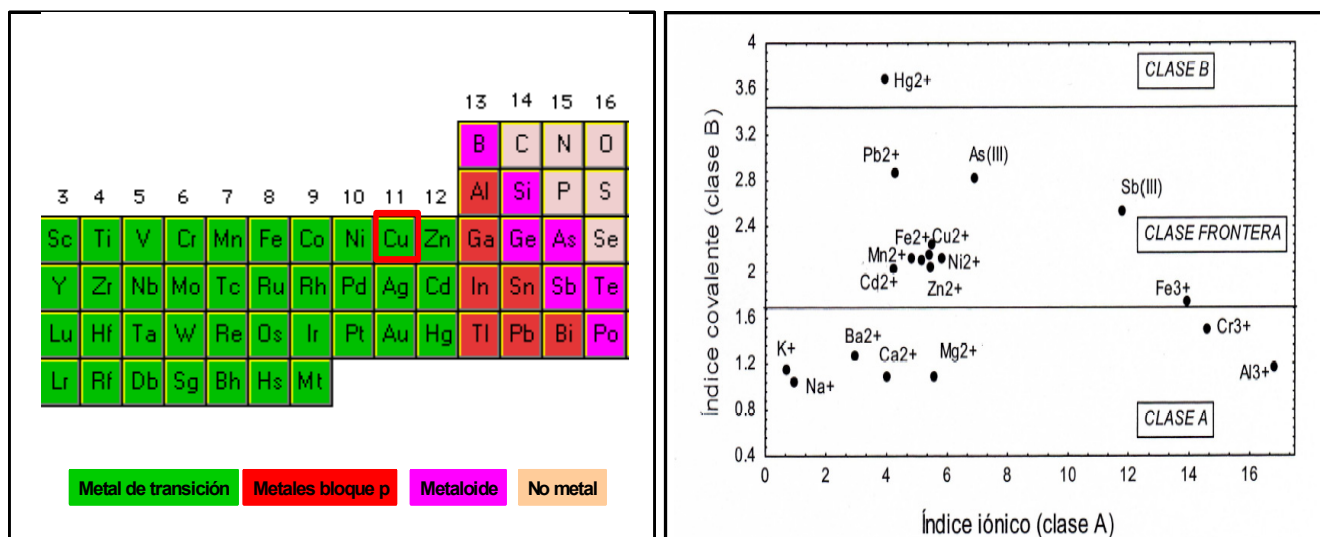


Fig. 1.1. Posición del Cu en el Sistema Periódico (izda.) y clasificación de los metales según el índice de covalencia (dcha.). Tomado de Poschenrieder y Barceló (2003)

1.2. Origen y contenido de Cu en el suelo

El origen del Cu en el suelo puede ser tanto natural como antropogénico (Tabla 1.2). Se habla de origen natural, cuando los contenidos de metales se atribuyen principalmente a la composición de los distintos minerales presentes en el suelo, así como, a los emitidos a la atmósfera por causas naturales, como incendios, volcanes y exudados de plantas (Loneragan, 1981; Alloway, 1995). El Cu es el vigésimo sexto elemento más abundante en la litosfera y la concentración media es de 70 mg kg^{-1} . Los contenidos naturales en el suelo suelen ser muy bajos, salvo en raras ocasiones. La concentración media es de $20\text{-}30 \text{ mg kg}^{-1}$, si bien, el intervalo de concentración normal en el suelo es de $10\text{-}80 \text{ mg kg}^{-1}$ (Alloway, 1995; Hagemeyer, 2004). La mayor parte del Cu en la naturaleza se presenta como minerales de sulfuros: calcocita (Cu_2S), covelita (CuS), calcopirita (CuFeS_2), bornita (Cu_5FeS_4) y enargita (Cu_3AsS_4). También puede encontrarse como minerales oxidados, cuprita (Cu_2O) y tenorita (CuO), así como, carbonatos, silicatos, sulfatos y cloruros (Alloway, 1995). La composición química de la roca madre y los procesos de meteorización condicionan, de forma natural, la concentración de los diferentes MP en los suelos (Ross, 1994). Los contenidos más elevados se encuentran en las rocas magmáticas básicas, ricas en minerales ferromagnésicos (peridotitos, micas negras, piroxenos). Por

el contrario, las rocas graníticas contienen en general menos Cu, y entre las sedimentarias, las arcillas y los esquistos presentan concentraciones superiores a las de las rocas detríticas como areniscas y arenas (Tabla 1.3).

Tabla 1.2. Origen natural y antropogénico de Cu en el suelo

Origen	
	Fuentes de Cu en el suelo
Natural	Roca madre y minerales metálicos Erupciones volcánicas Tormentas de polvo Descomposición de la vegetación Incendios forestales y aerosoles marinos
Antropogénica	Eliminación de basuras Combustión de carbón, petróleo y madera Acumulación accidental de contaminantes Deposición atmosférica Minería Industria Agricultura y ganadería
Tomado de Alloway (1995) y López Arias y Grau Corbí (2004)	

Tabla 1.3. Concentración típica de Cu (mg kg^{-1}) en los principales tipos de rocas

	Intervalo	Media
Basaltos	30-160	90
Granitos	4-30	15
Pyroxenitas	10-40	15
Pizarra y arcilla	30-150	50
Pizarra negra	20-200	70
Roca volcánica	5-20	
Piedra caliza	5-20	
Arenisca	5-20	
Litosfera		70
Corteza terrestre	24-55	
Suelo	2-100	20-30
Tomado de Alloway (1995)		

El origen del Cu en el suelo también puede deberse a otras causas; siendo en su mayoría de carácter antropogénico. En la actualidad, la mayoría de las entradas de este elemento son debidas a actividades agrícolas modernas (fertilizantes, fungicidas y purines de cerdo), mineras, industriales (metalurgia de metales no ferrosos) y urbanas (lodos de depuradoras y compost), pudiendo llegar a ocasionar la contaminación del suelo, cuando el contenido de Cu excede considerablemente de los valores normales para el tipo de suelo considerado (Fig. 1.2). La contaminación por MP de los suelos agrícolas es un proceso lento y continuo que puede afectar no sólo negativamente a la producción vegetal, sino también a la calidad de los alimentos. Los criterios para considerar un suelo contaminado por Cu dependen del uso del suelo y la legislación de cada país. El valor de la concentración tóxica crítica del Cu varía entre 60-125 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias y Pendias, 2000), mientras que, el máximo permitido en suelos de uso agrícola es de 50 mg kg⁻¹ MS (pH ≤ 7) y 210 mg kg⁻¹ MS a pH ≥ 7 (Real Decreto 1310/1990 y BOE 1.11.1990).

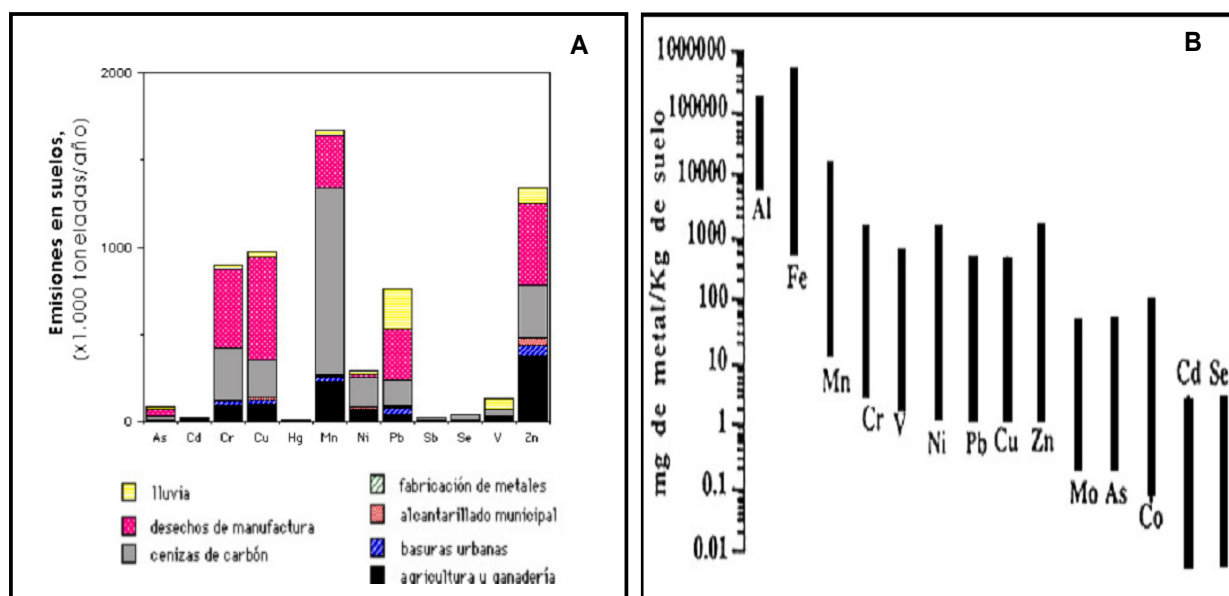


Fig. 1.2. Fuentes de contaminación antrópica de Cu y otros MP (A); intervalos de concentración de Cu y diferentes elementos en suelos no contaminados (B). Tomado de <http://www.unex.es/edafo/GCSPrograma.htm>

➤ *Contaminación por actividades agrícolas*

El uso continuado de lodos de depuradoras, fertilizantes, fungicidas, algicidas incrementan los niveles de Cu en suelos agrícolas (Tabla 1.4). Los lodos de depuradoras y otros residuos pueden tener elevadas concentraciones de Cu y la aplicación repetida de estos materiales puede contribuir a la contaminación de los suelos. Los niveles de MP en el suelo están regulados en base a la abundancia de estos metales en el suelo y en los lodos. Los suelos sobre los que podrán aplicarse los lodos tratados, deberán de presentar una concentración de MP inferior a la establecida en la Tabla 1.5; mientras que los lodos no deben presentar una concentración de Cu superior a 1000 mg kg^{-1} a $\text{pH} < 7$ y 1750 mg kg^{-1} a $\text{pH} > 7$. Actualmente, son muchos los países que regulan el contenido máximo de MP en los lodos de depuradoras o en el propio suelo, y este varía, en función de las características y uso del suelo, así como de la legislación de cada país. La m.o. del suelo retiene fuertemente al Cu, por lo que la velocidad de descomposición de los lodos debe considerarse a la hora de adicionarlos al suelo. Sin embargo, no se ha encontrado fitotoxicidad por el uso de lodos de depuradoras con niveles altos de Cu, cuando las plantas crecen en suelos encalados (Alloway, 1995). Además del efecto indirecto que pueda tener la adición de lodos sobre las plantas, también hay que considerar el que pueden ocasionar sobre la actividad biológica del suelo, la cual, parece ser más sensible a los lodos con niveles elevados de Cu.

Los suelos agrícolas son regularmente enmendados con fertilizantes pero también pueden recibir caliza y/o abonos orgánicos. Un fertilizante habitualmente empleado es el $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, aunque también se utilizan otros compuestos, mezclas y quelatos también son utilizados. Los fosfatos son los fertilizantes más ricos en Cu, presentando unos valores comprendidos entre $1\text{-}300 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$ (Tabla 1.4). Asimismo, residuos municipales compostados o sin compostar, han sido utilizados en suelos agrícolas de varios países, los cuales, contienen concentraciones variables de Cu. Del mismo modo, el empleo de purines de cerdo puede aumentar el nivel de Cu en los suelos, los cuales pueden contener hasta 750 mg kg^{-1} .

Por otro lado, el empleo continuado de fungicidas en zonas vitícolas, produce un aumento de la concentración de Cu en el suelo. Aproximadamente, 7×10^7 kg de Cu (caldo de Bordelés) es aplicado anualmente a los cultivos de vid, bananas, cítricos y otros cultivos (Alloway, 1995). En Francia, como resultado de su aplicación durante más de 100 años, la concentración de Cu en la superficie de los suelos vitícolas varía entre 110-1500 mg kg⁻¹, mucho mayor (20-30 mg kg⁻¹) que la que presentan normalmente los suelos agrícolas (Alloway, 1995; Kabata-Pendias y Pendias, 2000).

Tabla 1.4. Incorporación de Cu a los suelos debido a las prácticas agrícolas (mg kg⁻¹ MS)

	Intervalo
Lodos de depuradora	50-3300
Fertilizantes-P	1-300
Fertilizantes-N	1-15
Piedra caliza	2-125
Estiércol	2-60
Plaguicidas	12-50
Kabata-Pendias y Pendias (2000)	

Tabla 1.5. Valor límite de concentración de metales pesados en los suelos (mg kg⁻¹ MS)

Elementos	Valores límite	
	Suelos con pH < 7	Suelos con pH > 7
Cd	1	3,0
Cu	50	210,0
Ni	30	112,0
Pb	50	300,0
Zn	150	450,0
Hg	1	1,5
Cr	100	150,0
Real Decreto 1310/1990 y BOE 1.11.1990		

➤ Contaminación minera

La explotación minera también constituye una fuente de contaminación por Cu, tanto de suelos, como aguas superficiales y subterráneas. La minería en su conjunto, produce toda una serie de contaminantes gaseosos, líquidos y sólidos, que

de una forma u otra van a parar al suelo. Esto sucede ya sea por depósito a partir de la atmósfera, como por partículas sedimentadas o traídas por la lluvia, por el vertido directo de los productos líquidos de la actividad minera y metalúrgica, por la infiltración de productos de lixiviación del entorno minero: aguas provenientes de minas a cielo abierto, escombreras, etc., o por el depósito de elementos mineros sobre el suelo. La de escombreras puede inducir la infiltración de aguas de lixiviación, más o menos contaminadas en función de la naturaleza de la mena presente en la escombrera en cuestión. Por ejemplo, mientras hay minerales fácilmente lixiviables (p.ej., pirita, esfalerita), otros son mucho más estables (p.ej., galena). De esta manera, es más fácil introducir en las aguas Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} que Pb^{2+} . Del mismo modo, variaciones del pH por el drenaje ácido de la mina, hace que se obtengan aguas con un pH muy bajo (2-3), cargadas en aniones (sobre todo sulfatos), en las que generalmente son más solubles los MPs.

➤ *Deposición atmosférica*

El aire es el medio de transporte de los contaminantes que, generados en diferentes procesos, son vertidos a la atmósfera o quedan depositados en contacto directo con la misma. Los contaminantes del aire poseen unas características medio ambientales particulares, debido a que presentan una amplia dispersión, capacidad de ser transportados a largas distancias y bioacumulación al depositarse en los vegetales y suelos, por lo que son susceptibles de ser absorbidos por las plantas (Bogacz y col., 1991). En torno a zonas urbanas e industriales, la deposición atmosférica sigue siendo actualmente una importante entrada de metales que finalmente llegan a zonas forestales (Cao y col., 2008; Kyllönen y col., 2009). La deposición atmosférica de Cu en los suelos, procedente de la lluvia y de la deposición seca, varía considerablemente con la proximidad a la zona industrial emisora de Cu, así como, a la velocidad del viento. El tipo de respuesta a la deposición va a depender de la forma en la que se encuentre el Cu, pero también de la capacidad de adsorción del suelo (Alloway, 1995).

➤ *Contaminación industrial y urbana*

En la actualidad debido a la intensificación de la actividad industrial y al aumento de los residuos urbanos se está incrementando la contaminación por MP, y entre ellos el Cu. Mucha de la contaminación de Cu asociada con las actividades industriales y urbanas, está relacionada con la dispersión, la cual, depende enormemente de la meteorología local y los factores topográficos ([Baker y Senft, 1995](#)). Una de las mayores causas de contaminación industrial, lo constituye la metalurgia, ésta exhibe halos donde la concentración del contaminante disminuye exponencialmente con la distancia. La metalurgia de Zn incrementa substancialmente la cantidad de Cu, Zn, Cd, Pb y Ni. Además, se puede introducir Cu en los suelos y cultivos, debido a la corrosión del alambre, tubos y empleo de cables de alta tensión.

Los usos del Cu combinado con la combustión de carbón, fuel, madera y ciertos residuos, aumentan la concentración de este metal en el suelo. Como consecuencia de la combustión de carbón para generar electricidad, ciento de millones de toneladas de cenizas han sido liberadas cada año alrededor del mundo. La combustión de productos de madera, combustibles fósiles y residuos de incineración dentro de áreas urbanas, incrementa las emisiones atmosféricas de Cu, así como, la de otros elementos contaminantes. En cambio, [Loneragan \(1981\)](#) considera que el enriquecimiento de los suelos y plantas por la entrada de derivados de cenizas, es insignificante.

En general, la concentración de Cu en suelos procedentes de áreas urbanas es 5 a 10 veces superior que en los de áreas rurales, y el contenido de Cu en suelos contaminados por fuentes industriales es extremadamente elevado, alrededor de 3500 mg kg^{-1} , mientras que cuando el origen es de naturaleza agrícola, la concentración es aproximadamente 1500 mg kg^{-1} ([Kabata-Pendias y Pendias, 2000](#)).

El Cu no se degrada en el suelo y por eso se puede acumular en plantas y animales. En suelos ricos en Cu, sólo pueden vivir un número pequeño de plantas, debido a su fuerte carácter fitotóxico. Por esta razón, no hay una gran diversidad de

vegetales cerca de las fábricas o minas de Cu, por lo que es una seria amenaza para la cadena alimenticia. Asimismo, puede afectar e interrumpir la actividad biológica del suelo, teniendo un efecto negativo sobre la actividad de los microorganismos y de las lombrices de tierra. Del mismo modo, cuando el suelo está contaminado con Cu, los animales pueden ingerirlo dañando su salud, como ocurre en las ovejas, las cuales experimentan un envenenamiento, que se manifiesta incluso a bajas concentraciones de Cu.

1.3. Distribución y concentración de Cu en suelos españoles

En el conjunto de los suelos de la península Ibérica, el contenido de Cu en el 95% de los suelos es $< 49 \text{ mg kg}^{-1}$ (López Arias y Grau Corbí, 2004). Estos autores estiman que el intervalo de normalidad oscila entre 2 y 60 mg kg^{-1} , y consideran valores muy elevados a contenidos $> 2000 \text{ mg kg}^{-1}$. Ninguna de las muestras de suelo analizadas se aproxima a esta última cifra, siendo el máximo observado 1332 mg kg^{-1} (López Arias y Grau Corbí, 2004). En relación con la legislación de la UE, el 99% de los suelos españoles están por debajo de los $140 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ que se establecen como máximo tolerable. Respecto a los límites señalados por el Real Decreto 1310/1990, menos de un 2% de los casos están fuera de estos límites. Entre las medias provinciales destacan, por una parte, Huelva, Málaga, Lugo y Badajoz, cuya mediana es notablemente superior y, por otro lado, Valladolid, Almería, Teruel, Barcelona, Madrid y Zaragoza, sin que aparezca un hilo conductor claro de este agrupamiento (Fig. 1.3). Al hacer una desagregación por cultivos, los valores medios más elevados corresponden a zonas de olivar y viñedos (Tabla 1.6). La utilización intensiva de fungicidas explica, sin duda, estos resultados.

En la Comunidad Autónoma de Madrid, destaca la zona que abarca desde Colmenar Viejo hasta Valdemorillo, paralelos al escalón tectónico, y pasando por Torreloredones y Colmenarejo (Jordá, 2008). Los indicios de Cu más representativos corresponden a la antigua explotación minera de las minas de Colmenarejo, las cuales presentan filones de cuarzo y brechas filonianas, con una potencia entorno a un

metro, con sulfuros de Cu tales como la calcopirita, bornita y calcosina. Algunos de estos filones presentan corridas de más de 100 m (Garganta de los Montes) y profundidades de hasta 80 m con varias zonaciones de sulfuros (mina Pilar, Colmenarejo).

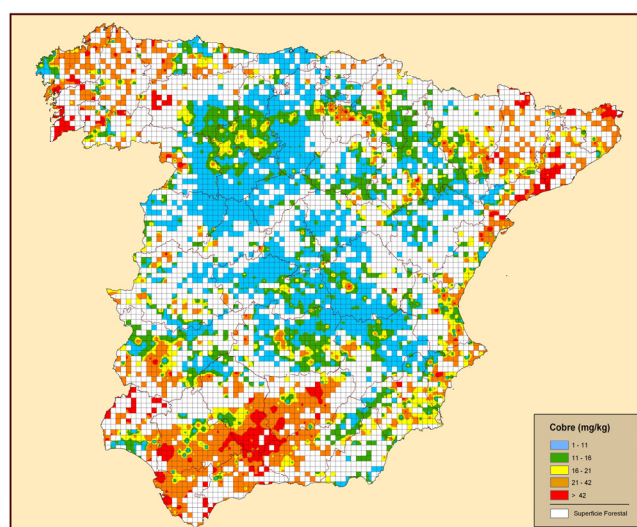


Fig. 1.3. Distribución de Cu en España. Tomado de López Arias y Grau Corbí (2004)

Tabla 1.6. Variación de los parámetros descriptivos de la distribución del contenido de Cu (mg kg^{-1}) según los grandes grupos de cultivo en España

Cultivo					
	Mínimo	Media	Máximo	Total	% cumplen Decreto
Cultivos forrajeros	0,0	13,2	100,0	446	99,8
Viñedos	1,0	26,6	772,0	239	95,4
Campos labrados	1,0	14,6	78,0	100	100,0
Cereales de grano	0,0	16,4	386,0	825	98,8
Tubérculos	3,0	22,1	70,0	22	86,4
Cultivos industriales	1,0	22,7	492,0	80	98,7
Leguminosas	5,0	18,2	69,0	12	100,0
Pastos	0,0	20,3	207,0	444	97,3
Frutales no cítricos	2,0	21,4	252,0	141	99,3
Forestal	1,0	21,2	103,0	56	98,2
Hortalizas	0,0	23,6	95,0	50	96,0
Terrenos improductivos	3,0	23,4	60,0	10	100,0
Cítricos	3,0	20,7	60,0	66	100,0
Olivar	2,0	33,6	1332,0	269	98,5
Tomado de López Arias y Grau Corbí (2004)					

1.4. Dinámica de Cu en el sistema suelo-planta

Debido a la toxicidad directa sobre la biota y la amenaza indirecta sobre la salud humana por la contaminación de las aguas subterráneas y la acumulación de MP en los cultivos, existe un interés generalizado en cuanto a la dinámica de los MP en la biosfera ([Martínez y Motto, 2000](#)). En general, el Cu incorporado al suelo, como puede observarse en la [Fig. 1.4](#), puede seguir cuatro vías diferentes: movilización hacia las aguas superficiales y/o subterráneas por procesos de lavado, escorrentía y erosión laminar, absorción por las plantas e incorporación a la cadena trófica, posible transferencia a la atmósfera por volatilización, si bien esta vía es de escasa importancia, o bien quedar retenido en el suelo. En este último compartimento, se suele encontrar asociado de diversas maneras a los constituyentes del suelo: i) dentro de las redes cristalinas de los minerales primarios y de constituyentes secundarios; ii) adsorbidos en hidróxidos de Fe, Al y Mn; iii) ligados a restos vegetales y animales; iv) incluidos en macromoléculas orgánicas; v) en forma de ión intercambiable en la superficie de las arcillas y de la materia orgánica (m.o.); vi) y también en forma soluble en la disolución del suelo.

El Cu recorre sucesivos compartimentos hasta llegar a la disolución del suelo, en donde las raíces lo captan, pudiendo también existir transferencias de otros compartimentos, en los cuales, el Cu está en cierta medida, disponible. Según [Banat y col. \(2005\)](#) para dilucidar el comportamiento de los MP en los suelos y prevenir efectos tóxicos potenciales, es necesario evaluar la disponibilidad y movilidad de los mismos, pues según la forma en la que se encuentren, así será su disponibilidad relativa para las plantas, y por tanto, su incorporación a la biota ([Tabla 1.7](#)). Los factores que influyen en la movilización del Cu en el suelo son: i) características del suelo, ii) naturaleza de la contaminación y iii) condiciones medio ambientales.

Tabla 1.7. Forma de retención en el suelo y disponibilidad relativa de los MP

Forma de retención del suelo	Disponibilidad relativa
Ión en la disolución del suelo	Fácilmente disponible
Ión en el complejo de cambio	Relativamente disponible
Metal quelado por compuestos orgánicos	Menos disponible
Metal precipitado o coprecipitado	Disponible sólo si ocurre alguna alteración química
Incorporado a la matriz biológica	Disponible después de la descomposición
Metal en la estructura mineral	Disponible después de la meteorización

En el suelo, los fenómenos que controlan los procesos de fijación de Cu son la adsorción, oclusión y precipitación, formación de complejos y quelatos orgánicos, así como, la fijación microbiológica del Cu ([Kabata-Pendias y Pendias, 2000](#)). Todos los minerales del suelo son capaces de adsorber Cu de la solución del suelo y estas propiedades dependen de la carga superficial que tenga el absorbente en cuestión, la cual, está fuertemente controlada por el pH. Este tipo de adsorción es importante en suelos con un gran contenido de minerales de carga variable. El Cu puede ser absorbido por los minerales del suelo dentro del intervalo de $0,001-1 \mu\text{M dm}^{-3}$ o de $30-1000 \mu\text{M dm}^{-3}$. La oclusión, co-precipitación y sustitución están implicadas en la adsorción no específica del Cu. Algunos minerales del suelo tales como hidróxidos de Fe y Al, carbonatos, fosfatos y silicatos, tienen una gran facilidad por unirse a parte del Cu del suelo en una forma no difusible, siendo ésta, la forma más estable del metal en el suelo ([Loneragan, 1981](#)). En esta quimiadsorción puede estar implicada la formación de enlaces por puentes de oxígeno.

La unión de Cu al suelo está relacionada con la formación de complejos orgánicos y es altamente dependiente del pH del suelo ([Kabata-Pendias y Pendias, 2000](#)). La quelación y complejación son las reacciones que gobiernan el comportamiento del Cu en los suelos. La complejación orgánica del Cu tiene una destacada implicación en la movilidad y la migración del Cu en el suelo. El Cu^{2+} se une principalmente a los grupos carboxílicos, pero también lo hace a grupos carbonilos y fenólicos, de manera que el ión es inmovilizado.

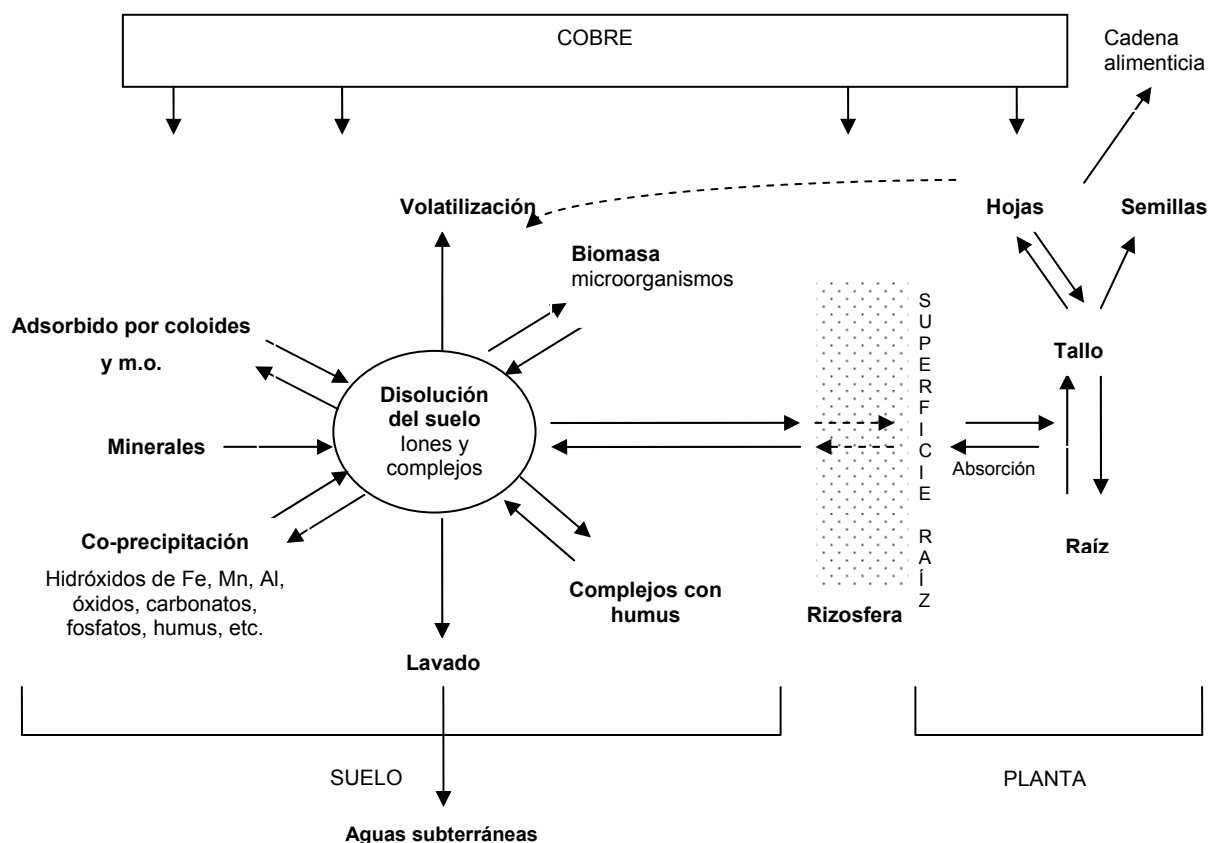


Fig. 1.4. Dinámica del Cu en el sistema suelo-planta. Adaptado de Peterson y Alloway (1979)

Los complejos orgánicos son generalmente más importantes en la disolución del suelo que los complejos inorgánicos, ya que, tienen una gran capacidad para complejar al Cu libre. La m.o. puede movilizar o inmovilizar el Cu^{2+} , dependiendo de la naturaleza de la superficie del mineral adsorbente y del tipo de m.o. Pequeñas moléculas de ácidos orgánicos solubilizan el Cu^{2+} por complejación o quelación, e incrementan por tanto, el Cu total disuelto en la disolución del suelo (Loneragan, 1981). Stevenson y Fitch (1981) encontraron que la máxima cantidad de Cu^{2+} que se puede unir a los ácidos fúlvicos y húmicos es aproximadamente igual al contenido de grupos funcionales ácidos. Estos ácidos forman complejos estables, cuando el Cu se encuentra en pequeñas cantidades. La turba y los ácidos húmicos inmovilizan fuertemente al Cu^{2+} , en directa coordinación con los oxígenos funcionales de la m.o.

La fijación microbiológica juega un papel prominente en la unión del Cu con la superficie de los suelos. La cantidad de Cu fijado por la microbiomasa es ampliamente variable, y está afectada por varios factores, tales como: concentración de metal, propiedades físico-químicas del suelo y fase de crecimiento. La fijación microbiológica de Cu es un paso importante en el ciclo ecológico del metal ([Kabata-Pendias y Pendias, 2000](#)).

1.5. Biodisponibilidad de Cu en el suelo

El suelo es un sistema dinámico sujeto a fluctuaciones a corto plazo. Diferentes propiedades físico-químicas del mismo, además de los factores biológicos, condicionan la solubilidad, especiación de los metales y con ellos, su biodisponibilidad. Se entiende por biodisponibilidad la fracción de MP que está disponible y puede ser absorbida por las plantas, y depende de la solubilidad, así como de la movilidad de los metales en la solución del suelo ([Brun y col., 2001](#)). La disponibilidad de los micronutrientes en la rizosfera suele estar muy limitada por su escasa solubilidad en agua y por la fuerte unión a partículas del suelo (aproximadamente el 98% de los metales del suelo forman algún tipo de complejo). Entre los factores del suelo que afectan a la acumulación y disponibilidad del Cu se encuentran: humedad, pH, potencial redox, textura, capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.) y el contenido de m.o. Además, la interacción del Cu con otros elementos puede aumentar o disminuir su disponibilidad, debido a que restringen o facilitan la absorción del Cu por las raíces.

Aunque el Cu es uno de los MP menos móviles en el suelo, este metal es abundante en la disolución del suelo, tanto como ión libre como complejo ([Fox y Guerinot, 1998](#)). La concentración de la disolución del suelo varía entre 3-135 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para su cuantificación, se debe utilizar agentes extractantes, reactivos poco agresivos y selectivos. Los productos de la hidrólisis del Cu (CuOH^+ y $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$) son la especies más significativas a $\text{pH} < 7$, en cambio, por encima de $\text{pH} 8$, lo son los complejos hidroxianiónicos de Cu. La solubilidad del CuCO_3 no depende del pH y este compuesto

parece ser la forma inorgánica soluble de mayor importancia en la solución neutra y alcalina del suelo, mientras que el nitrato, cloruro y los sulfatos complejan a una cantidad insignificante de Cu en el suelo. Sin embargo, la forma más común de Cu en la disolución del suelo son los quelatos orgánicos solubles. Aunque se conoce poco sobre las formas orgánicas solubles de Cu, se ha estimado que el 80% suelen ser quelatos orgánicos.

La biodisponibilidad de las formas solubles de Cu depende muy probablemente del peso molecular de los complejos de Cu, de la cantidad presente y del pH. A pH bajos, la elevada actividad de los H^+ compiten con el Cu^{2+} por unirse a los sitios de unión de la m.o., por tanto se reduce la complejación de Cu, en cambio, se incrementa la concentración y la actividad del Cu^{2+} en la disolución. Asimismo, los H^+ compiten con el Cu^{2+} a la hora de unirse a la pared celular, y como consecuencia reducen la biodisponibilidad (Plette y col., 1999). A pH 7 alcanza el mínimo, sin embargo, a pH superiores vuelve a aumentar la solubilidad del Cu debido a la formación de complejos orgánicos solubles, mientras que es bastante baja la presencia de Cu^{2+} (McBride, 1981).

Del mismo modo, la disponibilidad de Cu en el suelo puede verse afectada por la presencia de otros elementos. La aplicación de grandes y continuas cantidades de fosfatos en suelos en los que el contenido de Cu es bajo, produce grandes deficiencias de este elemento en la planta (Navarro y Navarro, 2003). La actividad del Ca^{2+} y el Mg^{2+} también pueden influir en la fitodisponibilidad de este metal, a través de uniones competitivas como ocurre con los H^+ (Alva y col., 1993; Lu y Allen, 2002), así como el potencial redox y la textura (Fig. 1.5). En general, bajo condiciones oxidantes, el Cu está más disponible para las plantas. Las arcillas tienden a adsorber el Cu, por el contrario, los suelos arenosos carecen de capacidad de fijación de los metales, pasando rápidamente al subsuelo y contaminando los niveles freáticos.

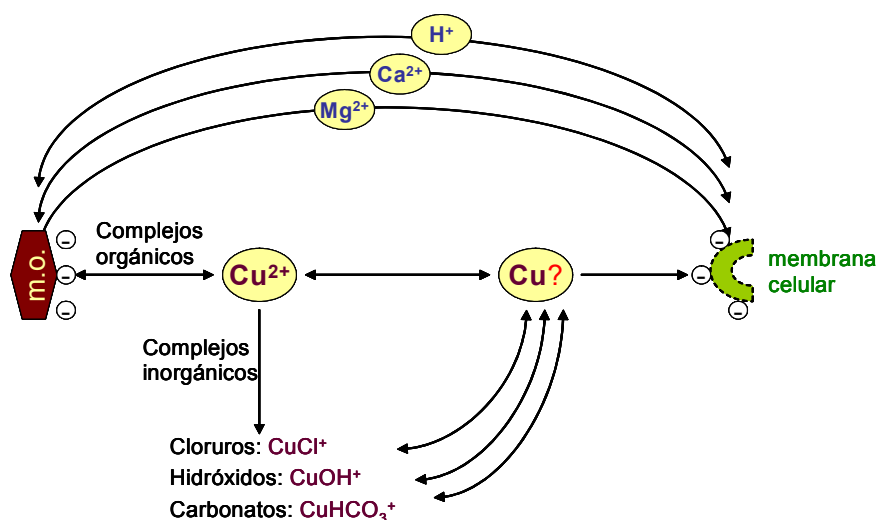


Fig. 1.5. Factores que afectan a la disponibilidad de Cu en la disolución del suelo. Tomado de Ling (2006)

1.6. Absorción y transporte de Cu en las plantas

Los metales se encuentran presentes en el aire, agua, sedimentos y en el suelo; es en estos medios de donde los toma la planta. Las plantas absorben los metales que se encuentran en el agua de la lluvia y/o rocío o bien en el aire a través de las hojas, mientras que los presentes en el suelo y sedimentos, los absorben por la raíz (Greger, 2004). Sin embargo, la tasa de absorción depende de la especie vegetal, condiciones ambientales, del tipo de suelo, fertilización y de la aplicación de agroquímicos.

Las raíces poseen mecanismos tanto activos como pasivos de entrada de elementos minerales, por lo que su tasa de absorción estará gobernada por mecanismos fisiológicos que son determinantes para la supervivencia de la planta. Sin embargo, para mantener la homeostasis de los elementos en rangos que las permitan la supervivencia, las plantas han desarrollado mecanismos de regulación de la absorción de elementos traza, que comprenden procesos de movilización, distribución, almacenamiento y detoxificación (Verkleij y col., 2009).

➤ *Alteración de la movilidad de Cu en el suelo*

En los procesos de absorción de los elementos traza, la raíz posee una importante actividad en su movilización, ya que éstos se encuentran en su mayoría unidos a uno o a varios constituyentes del suelo. La raíz promueve una gran variedad de factores modificadores, como H^+ , agentes quelantes, componentes reductores y sustancias que estimulan la biomasa de microorganismos. Los cuales modifican la actividad química y biológica de la rizosfera, alterando de esta forma la absorción de elementos por la raíz (Palacios, 1997). Con respecto al Cu, los mecanismos más destacables son la acidificación de la rizosfera y la reducción del metal. La acidificación favorece la solubilización de los micronutrientes. Existen evidencias de que el déficit de Cu induce una acidificación de la rizosfera (Cohen y col., 1997). En *Arabidopsis thaliana*, se ha identificado la familia de H^+ -ATPasas AHA (*Arabidopsis H⁺-ATPase*), alguno de cuyos miembros podría estar implicado en este proceso de acidificación (Palmgren, 2001; Gaxiola y col., 2007).

Por otro lado, existen evidencias contradictorias en relación a la reducción del metal como requisito previo a su asimilación de la planta. Según Bienfait (1988), la liberación de Cu^+ en la superficie de la raíz podría ser una forma de desestabilizar los complejos que forma el Cu^{2+} en la rizosfera, de la misma manera que ocurre tras la liberación de Fe^{2+} . Asimismo, los transportadores de Cu de alta afinidad identificados en la membrana plasmática son específicos de Cu^+ . Ciertos autores (Norvell y col., 1993; Cohen y col., 1997) han observado que las deficiencias de Fe y Cu, pero no de otros elementos, inducen la actividad reductasa de las raíces de guisante y soja. Además, existen evidencias de que el déficit de Cu, induce un aumento de la actividad reductasa, paralelamente a la acidificación de la rizosfera. Ambos mecanismos son independientes y podrían contribuir de forma independiente a la absorción de Cu (Yi y Guerinot, 1996; Cohen y col., 1997).

En *Arabidopsis*, se ha identificado la familia de reductasas de metales FRO (ferric reductase oxidase), compuesta por 8 miembros (Mukherjee y col., 2006). La proteína FRO2 muestra actividad reductasa de Cu en deficiencia de Fe (Yi y Guerinot,

1996; Robinson y col., 1999). Respecto a FRO3, su expresión se acentúa en raíces de *Arabidopsis* deficientes en Fe y Cu, sugiriendo su papel en la adquisición de estos dos metales (Wu y col., 2005; Mukherjee y col., 2006). Por el contrario, también hay datos experimentales que sugieren que la reducción del Cu, no es esencial para la absorción del metal. Por ejemplo, las plántulas del mutante *frd1* de *Arabidopsis*, que presentan una actividad reductasa limitada en las raíces, no ven menguada su capacidad para acumular Cu (Yi y Guerinot, 1996).

➤ *Absorción de Cu por la raíz*

Una vez movilizados, los nutrientes deben ser capturados por la planta. El movimiento de los iones hacia las raíces está regido por la difusión, interceptación radicular y flujo de masas. Según Greger (2004), el lugar exacto de la raíz, por donde se absorben los metales depende del elemento considerado. Algunos son captados por la región apical, mientras que otros, pueden ser absorbidos por toda la superficie radicular. También se ha observado que las raíces jóvenes, aún sin la banda de Caspary desarrollada, absorben gran parte del metal (Marschner, 1995). Además, se ha comprobado que el perfil de absorción a lo largo del eje longitudinal radicular varía según el tipo de ión, el estado nutricional de la planta y la especie vegetal considerada (Marschner, 1995). En dicotiledóneas, el ritmo de entrada de iones por unidad de longitud, disminuye a medida que aumenta la distancia al ápice radicular. En el caso del Cu, se ha detectado una absorción uniforme a lo largo del eje de la raíz de maíz, mientras que en condiciones de deficiencia, se intensifica la capacidad de absorción en la zona apical, pero no en la basal (Bell y col., 1991).

Una vez en el interior de las raíces, los nutrientes se distribuyen por toda la planta a través del xilema, impulsados por la corriente ascendente de agua que genera el flujo de transpiración. Los iones y el agua se transportan radialmente en la raíz para alcanzar el xilema a través de dos vías: simplástica (entrada dentro de las células) o apoplástica, en un flujo desde la epidermis hasta la banda de Caspari a través del espacio libre intercelular (Fig. 1.6). La banda de Caspari, supone una

barrera infranqueable que obliga a los iones a continuar el camino por la vía simplástica.

El transporte de Cu al simplasto, constituye el primer mecanismo de homeostasis del metal a nivel celular y, por tanto, su control resulta crítico para regular los niveles intracelulares. A nivel de la membrana celular, la absorción de los iones se produce de forma general mediante proteínas transportadoras. La absorción de los iones se puede producir por transporte activo o pasivo. Se ha observado que cuando los nutrientes se encuentran en el suelo dentro del intervalo de normalidad, la absorción está controlada metabólicamente. Pero cuando se alteran las propiedades de las membranas radicales, por un exceso y por la presencia de contaminantes (Cd, Cu, Hg, Pb), la mayoría son absorbidos de forma pasiva (Kabata-Pendias y Pendias, 2000). A pesar de las controversias, se ha observado que la velocidad de absorción está directamente relacionada con la concentración del MP en el medio externo.

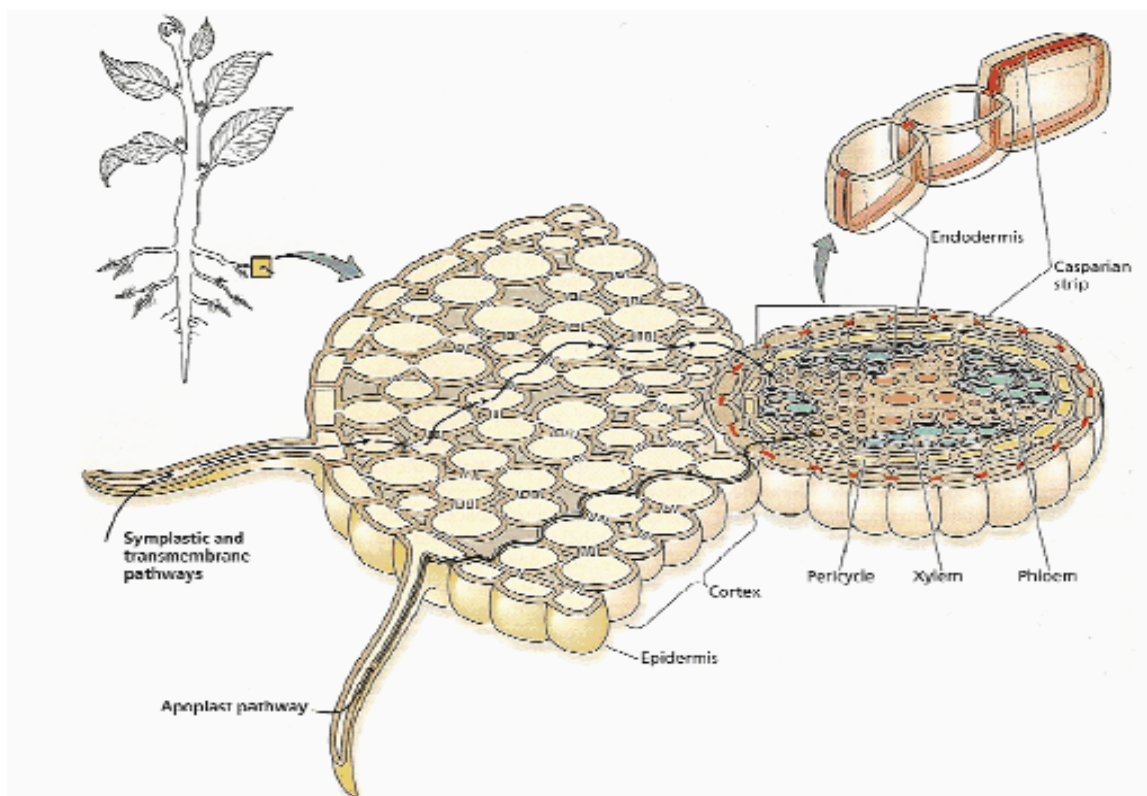


Fig. 1.6. Esquema del transporte radial de nutrientes en la raíz. Tomado de Zeiger y col. (2002)

Las células eucariotas disponen de una amplia variedad de transportadores metálicos con diferente especificidad por el sustrato y propiedades cinéticas. En la captación de Cu hacia el citosol participa según varios autores ([Sancenón y col., 2003](#); [Burkhead y col., 2009](#); [Yruela, 2009](#)) la familia de transportadores de Cu de alta afinidad COPT (copper transporter) homólogos a los miembros de la familia CTR (copper transporter) de levadura ([Dancis y col., 1994](#); [Knight y col., 1996](#)). Todavía no está claro cómo funcionan estos transportadores, pero es probable que el Cu sea incorporado al citosol celular como Cu^+ . En *Arabidopsis thaliana*, el transporte de Cu se realiza a través del transportador COPT1. Este transportador está localizado en la membrana plasmática de la zona apical de la raíz ([Sancenón y col., 2004](#); [Burkhead y col., 2009](#)). Otra familia de transportadores, que podría contribuir a la incorporación de Cu en el citosol, es la de metales divalentes ZIP (*ZRT/IRT-related protein*). La preferencia de los miembros de la familia ZIP por metales divalentes sugiere que las proteínas ZIP2 y ZIP4 podrían transportar iones Cu^{2+} , sin necesidad de una reducción previa del metal. Además se ha descrito, que los genes que los codifican están regulados en deficiencia de Cu ([Mukherjee y col., 2006](#); [Burkhead y col., 2009](#)).

Una vez en el interior de las células de la raíz, el Cu podría ser transportado radialmente por vía simplástica unido a nicotianamina (NA) formando el complejo Cu^{2+} -NA ([Pich y col., 1994](#)). En el momento en el que este complejo Cu^{2+} -NA llega al cilindro vascular de la raíz se descarga a los vasos del xilema ([Sancenón y col., 2004](#)). Según [Wintz y col. \(2003\)](#) el Cu podría ser transportado al interior de xilema a través de un transportador llamado OPT3.

➤ *Transporte de Cu a la parte aérea*

La translocación a larga distancia depende de la especie y edad de planta, el órgano, así como del metal. La movilidad del Cu dentro de los diferentes tejidos vegetales depende del nivel de Cu añadido, siendo mayor cuanto mayor es el aporte de este elemento. Sin embargo, este metal tiene una relativa baja movilidad comparado con la de otros (Cd, Zn, Mn) y sólo pequeñas cantidades se mueven hacia los órganos jóvenes ([Greger, 2004](#)). En el transporte de los MP dentro de los tejidos y

órganos de la planta, están implicados varios procesos: i) movimiento en el xilema, ii) movimiento en el floema y iii) almacenamiento, acumulación e inmovilización. La quelación de los ligandos tiene gran importancia en el control de la translocación del metal en las plantas, sin embargo, otros factores tales como el pH, potencial redox, competición con otros cationes, hidrólisis, polimerización y la formación de sales insolubles, controlan la movilidad dentro de los tejidos de las plantas.

La translocación de los metales a la parte aérea es realizada por el xilema y es promovida por la pérdida del agua a través de las hojas, por algunos iones metálicos, cationes de cambio, proteínas transportadoras y las cargas negativas de la pared de las células del xilema (Greger, 2004). Una vez en el interior del xilema, son generalmente translocados como cationes divalentes o unidos a moléculas orgánicas. Algunos trabajos han mostrado que el Cu es transportado formando complejos con aminoácidos (Greger, 2004). Pich y Scholz (1996) encontraron que la NA está involucrada en la translocación de Cu^{2+} desde la raíz hasta la parte aérea de la planta formando complejos Cu^{2+} -NA. Liao y col. (2000) observaron que el Cu también puede ser transportado coordinado con histidina. Asimismo, se ha propuesto que los ácidos orgánicos, especialmente el citrato, podrían ser los principales ligandos metálicos en el xilema (Haydon y Cobbett, 2007) y que el transportador FRD3 (*ferric reductase defective 3*) podría participar en el transporte ascendente de citrato, facilitando la distribución de metales por la planta (Durrett y col., 2007). En el xilema, los grupos carboxílicos de la pared celular actúan como intercambiadores catiónicos de baja afinidad y selectividad que restringen el libre movimiento de solutos cargados positivamente, excluyendo los aniones. Por este motivo, los complejos metálicos aniónicos son transportados más eficientemente (Senden y col., 1990). En las raíces y en el xilema más de un 98-99% del Cu está presente en forma de complejos. Algo similar ocurre en el citoplasma y en los orgánulos, donde la concentración de Cu^{2+} y Cu^+ es extremadamente baja (Marschner, 1995).

El complejo Cu^{2+} -Na es volcado desde el xilema al apoplasto de las hojas mediante el transportador AtYSL2 (Didonato y col., 2004). Una vez que el Cu entra en

la hoja, se distribuye a los diferentes orgánulos subcelulares, principalmente al cloroplasto, a través de diversos mecanismos de homeostasis intracelular. De la misma manera que existe controversia con la necesidad de reducir el Cu^{2+} a Cu^{+} antes de ser incorporado por la raíz, no se sabe si el Cu se reduce en el apoplasto antes de entrar a las células del mesófilo. Se ha propuesto que una reductasa (*AtFRO6*) podría reducir el Cu^{2+} a Cu^{+} en la membrana plasmática de las células del mesófilo (Mukherjee y col., 2006).

El transporte de metales por el floema, es difícil debido al elevado pH y a las altas concentraciones de P, pero es posible debido a la formación de complejos con moléculas orgánicas (Poschenrieder y Barceló, 2003). Estudios con *Ricinus communis* L. involucran a la proteína ITP (*iron transport protein*) y al aminoácido NA en la distribución de Fe y Cu a través del floema (Krüger y col., 2002). Además, se ha observado que en condiciones de senescencia, el Cu puede transportarse por el floema unido a distintas metalotioneínas (Guo y col., 2003) y a la chaperona de Cu CCH (Mira y col., 2001).

1.7. Contenido y distribución de Cu en los distintos órganos de la planta

El intervalo de normalidad de Cu en las hojas de las plantas se encuentra entre 2-20 mg kg^{-1} MS (Reuter y Robinson, 1997). El contenido medio en plantas no contaminadas se estima en unos 10 mg kg^{-1} MS, mientras que en las contaminadas se duplica esta cifra (Barber, 1995; Kabata-Pendias y Pendias, 2000).

La distribución de los nutrientes entre parte aérea y raíz varía en función de la especie y cultivar, así como, con las condiciones ambientales, y depende del tipo de ligando químico al que se coordinan (Loneragan, 1981; Prasad, 2004). Durante el transporte por la planta, los metales pueden unirse a la pared celular, así como, a las metalotioneínas (MTs) y fitoquelatinas (PCs), lo cual explica por qué gran parte del metal en la planta se localiza en la raíz (75-90%), y una pequeña cantidad es translocado al vástago. Otros autores (MacFarlane y Burchett, 2002; Wolterbeek y Van Der Meer, 2002) han observado, que la elevada concentración de Cu encontrada

en raíz, respecto a la de los órganos aéreos, es atribuible a la existencia de un bajo ritmo de translocación. En este sentido, la concentración de Cu encontrada en raíces de maíz crecido en suelos contaminados, son muy elevadas y aumentan según lo hace el Cu en el suelo, mientras que en parte aérea varía ligeramente y permanece siempre baja (Brun y col., 2001; McBride, 2001). Niveles elevados de Cu en el vástago han sido relacionados con fases de intenso crecimiento o con la aplicación de dosis elevadas de Cu. En los órganos fotosintéticos, una parte considerable del Cu parece estar unida a la plastocianina y a algunas fracciones proteicas (Kabata-Pendias y Pendias, 2000). Además, hay una tendencia a acumular Cu en los órganos reproductivos, pero esto difiere entre especies. La concentración más alta de Cu se ha encontrado en el embrión y en la cubierta seminal de cereales. La distribución relativa de los MP en la parte aérea, comparado con la concentración de estos en el medio externo se muestra en la Fig. 1.7.

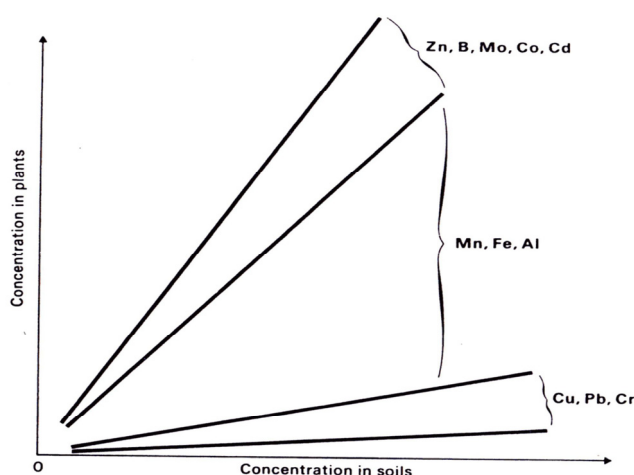


Fig. 1.7. Distribución de MP en vástago en función de la concentración en el suelo (Alloway, 1995)

1.8. Funciones del Cu en la planta

El Cu es un cofactor que interviene en el transporte de electrones durante la fotosíntesis y la respiración, así como en el mecanismo de detoxificación de radicales libres generados en el metabolismo. Este metal tiene un gran carácter oxidante y una elevada aptitud para formar complejos de coordinación con moléculas orgánicas.

Presenta una elevada afinidad por los grupos peptídicos y sulfhídricos, proteínas ricas en cisteína, así como por grupos carboxílicos y fenólicos. Estas características del Cu permiten su uso en cuproproteínas, que han evolucionado ajustando la estabilidad y el potencial redox de sus centros de Cu a la función que desarrollan. En este sentido, se conocen diversas cuproproteínas con diferentes funciones biológicas, las cuales se pueden clasificar en tres grupos:

➤ *Cuproproteínas que participan en el transporte de electrones*

a) *Proteínas azules de cobre o cuprodoxinas*

Plastocianina: es una óxido-reductasa asociada a la cara luminal de la membrana tilacoidal de los cloroplastos (Weigel y col., 2003). Proteína implicada en el transporte de electrones en las cadenas fotosintéticas. Se encuentra en los organismos fotosintéticos (cianobacterias, algas y plantas superiores) y se cree que más del 50% del contenido de Cu en el cloroplasto, está unido a esta proteína.

Plantacianina: pertenece a la familia de la fitocianinas y es una proteína azul de Cu, que se encuentra localizada en el apoplasto del polen y participa en la guía del tubo polínico en el estigma (Dong y col., 2005).

b) *Oxidasas azules o multicobre oxidasas (MCOs)*

Ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3): cataliza la oxidación de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico. Se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos vegetales (tallos, flores, frutos y semillas), así como en células diferenciadas y no diferenciadas (Chichiricco y col., 1989). A nivel celular, se ha localizado en la pared celular y en el citoplasma (Nersisyan y Shipp, 2002). Puede actuar como oxidasa terminal de la cadena respiratoria o en combinación con la enzima polifenol oxidasa.

➤ *Cuproproteínas involucradas en el transporte y oxidación del oxígeno molecular y en la reducción de compuestos inorgánicos*

Citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1): es una oxidasa terminal de la cadena de transporte electrónico mitocondrial que cataliza la transferencia de electrones. La energía que se produce tras este proceso es utilizada para bombear H^+ hacia el exterior de la membrana mitocondrial y sintetizar ATP.

Diamino oxidasa (EC 1.4.3.6): es una flavoproteína que pertenece a la familia de las amino oxidasas que contienen Cu en su estructura. Su función consiste en catalizar la oxidación aeróbica de poliaminas a aldehídos. En plantas, se encuentra localizada en el apoplasto de la epidermis y en el xilema de tejidos maduros (Marschner, 1995). En general, las amino oxidasas de plantas participan en el crecimiento y desarrollo de la planta, y en los mecanismos de defensa a través de la formación de metabolitos secundarios (Cona y col., 2006).

Polifenol oxidasa (EC 1.14.18.1): es abundante en la pared celular, donde participan en la biosíntesis de lignina y en las membranas tilacoidales, donde se ha comprobado que se requieren para la síntesis de pigmentos (betalainas) y para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (Marschner, 1995; Marusek y col., 2006).

➤ *Cuproproteínas con diversas funciones*

En plantas, las proteínas que pertenecen a esta familia son las cuprozinc superóxido dismutasas (CuZnSODs), las cuprochaperonas, las metalotioneínas y las Cu-ATPasas (Lindley, 2001). La CuZnSOD (EC 1.15.1.1) constituye una de las defensas primarias frente a las especies reactivas de oxígeno. Se localiza en el apoplasto, citosol, cloroplastos, glioxisomas, núcleo y espacio intermembrana mitocondrial. Las dos isoenzimas mayoritarias son la CuZnSOD citosólica y la CuZnSOD cloroplástica; esta última puede encontrarse tanto en el estroma (forma soluble) como en los tilacoides (asociada a membranas). Los átomos de Cu y Zn de su centro activo están

directamente involucrados en los mecanismos de detoxificación de radicales de O₂ generados durante la fotosíntesis.

Las cuprochaperonas pertenecen a una familia de pequeñas proteínas citosólicas encargadas de la distribución intracelular de Cu a los diferentes compartimentos subcelulares y a las proteínas que requieren Cu en su grupo prostético.

Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular, que tienen un alto contenido en cisteínas. Se encargan de complejar el Cu y otros MP (Cd), cuando se encuentran en exceso en la célula e intervienen en su detoxificación. Las metalotioneínas actúan en los mecanismos de tolerancia a Cu, en el proceso de senescencia y se sobreexpresan en los tricomas cuando hay exceso de Cu ([Clemens, 2001](#); [Cobbet y Goldsbrough, 2002](#)).

También se ha descrito la función del Cu en la síntesis del cofactor de molibdeno ([Kuper y col., 2004](#)). Este hecho permite relacionar el metabolismo del Cu con la asimilación de nitrógeno (N), biosíntesis de fitohormonas y catabolismo de purinas ([Mendel, 2005](#)).

1.9. Deficiencia de Cu

La deficiencia de Cu se observa a menudo en plantas que crecen en suelos donde el nivel del metal es bajo de forma inherente (ej. suelos calcáreos) y en suelos con alto contenido de m.o., donde el Cu está complejoado. La elevada disponibilidad de N puede también acentuar la deficiencia de Cu.

El nivel crítico de deficiencia de Cu en la parte vegetativa de la planta está comprendido entre 1-5 mg kg⁻¹ MS, dependiendo de la especie vegetal, del órgano de la planta, del estado de desarrollo y de la cantidad de N aplicado. La sensibilidad a la deficiencia de Cu, difiere considerablemente entre las especies, siendo el trigo, la avena y las espinacas más sensibles que el guisante, centeno y la colza ([Marschner,](#)

1995). Normalmente, los primeros síntomas de deficiencia aparecen en las hojas jóvenes y están asociados a puntos cloróticos que se extienden desde la punta hacia los márgenes de la hoja. En general, los síntomas visuales más frecuentes son: *i)* atrofiamiento y marchitamiento; *ii)* clorosis; *iii)* necrosis; *iv)* retardo de la senescencia y madurez; otras alteraciones incluyen disminución de la concentración de carbohidratos en los tejidos vegetativos, alteración de la composición lipídica de las membranas, inhibición de diversas actividades enzimáticas, estrés oxidativo, bloqueo de la fotosíntesis a nivel del fotosistema I y una ligera disminución de la respiración a través de la inhibición parcial de la actividad de la enzima citocromo c oxidasa (Marschner, 1995).

Otro síntoma característico es una mala lignificación, que ocurre incluso en situaciones de ligera deficiencia. En estas condiciones, el tallo se dobla y las hojas se curvan y presentan un aspecto deformado debido a la insuficiente lignificación de los vasos del xilema. Estas anomalías ocurren por un descenso severo de la actividad de las enzimas diamino oxidasa y polifenol oxidasa (Marschner, 1995). A su vez, el Cu es necesario para la lignificación de la antera, lo que causa su rotura liberando de esta manera el polen. Así, en estadíos de deficiencia de Cu este proceso no ocurre y el polen no es viable, además disminuye la formación de los órganos reproductores, lo que se traduce en pérdidas importantes en la producción de semillas. Las anteras y ovarios son los componentes de la planta con más Cu, esto pone de manifiesto la necesidad de fertilizar con Cu durante la época reproductora, con la finalidad de mejorar los rendimientos (Marschner, 1995). En los cereales, la fase reproductora es más sensible que la vegetativa al déficit de Cu.

Aplicaciones foliares de Cu en forma de sales inorgánicas, óxidos y quelatos, es una medida rápida para corregir la deficiencia de Cu. La aplicación al suelo de estos compuestos es el método más adecuado para la corrección de la deficiencia a largo plazo (Marschner, 1995).

1.10. Toxicidad de Cu

La principal causa del elevado grado de toxicidad de los MP a nivel bioquímico, es que poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas. En este sentido, cabe destacar la gran afinidad que muestran por grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El resultado de estas uniones ligando-metal puede ser muy perjudicial para la célula, destacando: la acción genérica sobre proteínas por inhibición de la actividad o por disrupción en la estructura de las mismas y el desplazamiento de elementos esenciales, produciendo efectos de deficiencia y la catálisis de reacciones de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo (Navarro y col., 2007).

La fitotoxicidad producida por la elevada concentración de los MP es debida tanto a su toxicidad intrínseca como al carácter acumulativo de cada elemento, es decir, a su elevada tendencia a la bioacumulación (Gupta y Gupta, 1998; García y Dorronsoro, 2001). El grado de acumulación y el índice de bioacumulación en las plantas son de grado medio para el Cu (Fig. 1.8).

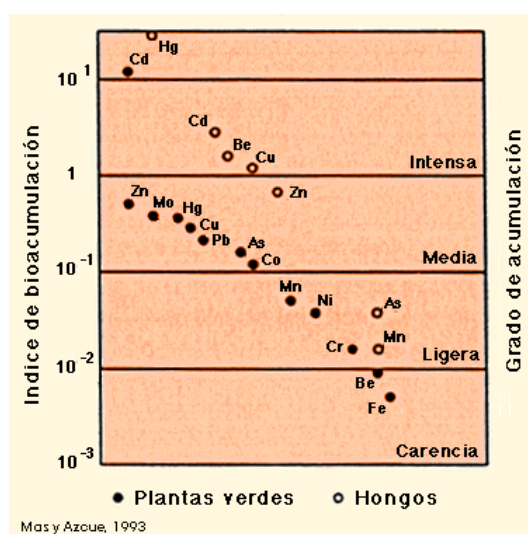
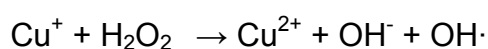


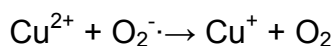
Fig. 1.8. Grado de acumulación de los MP. Tomado de <http://edafologia.ugr.es/conta>

La toxicidad producida por el exceso de Cu origina una sintomatología externa que puede variar de una especie vegetal a otra. Pero, en general, provoca clorosis y necrosis, atrofiamiento, decoloración de las hojas, descenso en el contenido de clorofilas, alteración de la morfología y de la biomasa de la hoja y, especialmente de la raíz (Loneragan, 1981; Kabata- Pendias y Pendias, 2000; Mengel y Kirkby, 2001). La inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz es uno de los primeros síntomas de toxicidad y se suele usar como un indicador precoz en especies sensibles y tolerantes.

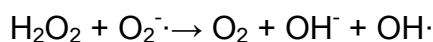
A nivel celular, la toxicidad de Cu puede ocasionar la inhibición de diversas actividades enzimáticas y de la función de proteínas, peroxidación de lípidos, estrés oxidativo, alteraciones en la estructura de los cloroplastos y en la composición de las membranas tilacoidales (Loneragan, 1981; Mengel y Kirkby, 2001; Prasad, 2004). Asimismo, puede producir una modificación de la morfología de los cromosomas durante el proceso de división celular (Jiang y col., 2001). Las mismas propiedades redox que explican el funcionamiento del Cu en la catálisis de múltiples reacciones biológicas y que, por tanto, hacen que sea un elemento esencial, son las responsables de su toxicidad (Halliwell y Gutteridge, 1989). La capacidad del Cu para cambiar su estado redox cuando entra en contacto con productos intermediarios del metabolismo aerobio, conocidos como especies reactivas de oxígeno, le hace ser fuertemente citotóxico, ya que induce la producción de radicales hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 1989). Estas especies reactivas ($O_2^{\cdot-}$, radical superóxido; O_2^{2-} , anión peróxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; OH^{\cdot} , radical hidroxilo) son generadas por la reducción incompleta del oxígeno molecular durante la fotosíntesis y la respiración, y su producción se intensifica con temperaturas extremas, radiación de elevada intensidad, sequía o contaminantes atmosféricos. En estas condiciones, el Cu en estado reducido puede generar radicales $^{\cdot}OH$ mediante la catálisis de la reacción de Fenton:



El Cu^{2+} se puede volver a reducir en presencia del radical superóxido:



El balance neto de estas dos reacciones es lo que se conoce como reacción de Haber-Weiss:



El radical OH^{\cdot} es uno de los oxidantes más poderosos que se conocen, capaz de reaccionar rápidamente con numerosos compuestos celulares esenciales, incluyendo lípidos de membranas, proteínas, carbohidratos y ADN ([Halliwell y Gutteridge, 1989](#)). Así, se ha observado un descenso en el contenido de lípidos y una modificación de la composición de ácidos grasos de las membranas tilacoidales. Como consecuencia, se han encontrado modificaciones en el funcionamiento del fotosistema II (PSII) en la membrana tilacoidal ([Maksymiec y col., 1994](#); [Yruela y col., 1996](#); [Quartacci y col., 2000](#)). [Jonak y col. \(2004\)](#) han observado que el exceso de Cu activa la cascada de MAPK quinasas (“mitogen-activated protein kinases”), de forma que estas proteínas están involucradas en la transducción de la señal inducida por el MP. Además, también se ha observado que el estrés oxidativo, provocado por un exceso de Cu, podría actuar a diferentes niveles sobre las auxinas y, consecuentemente, sobre la morfología y crecimiento de las plantas ([Pasternak y col., 2005](#)).

Otro hecho que hace que el Cu sea muy tóxico, deriva de su capacidad de interaccionar inespecíficamente con cadenas laterales de aminoácidos (cisteína, metionina e histidina). Este efecto puede producir cambios conformacionales en las proteínas, bloqueo del sitio activo, y la inactivación de su función biológica ([Koch y col., 1997](#); [Yang y col., 2006](#)). El exceso de Cu, también causa la reducción de la enzima nitrato reductasa que es necesaria para la reducción del nitrato. Lo cual, se traduce en un menor contenido de N total tanto en la raíz como en las hojas ([Llorens y col., 2000](#)).

Las plantas poseen una gran variedad de mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo, que incluyen a los sistemas antioxidantes enzimáticos (superóxido

dismutasas, catalasas, guaiacol peroxidasas, polifenol oxidasa, glutatión peroxidasa, ciclo ascorbato-glutatión) y a los no enzimáticos (carotenoides, ascorbato, glutatión, α -tocoferol). En las plantas, el exceso de Cu provoca una respuesta inmediata de los sistemas antioxidantes debido a la generación de ROS. Así, se han descrito cambios en la actividad y en el contenido de algunos de los componentes de la maquinaria antioxidante tales como ascorbato peroxidasa, monodehidroascorbato reductasa, dihidroascorbato reductasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasas y guaiacol peroxidasa (Gupta y col., 1999; Drazkiewicz y col., 2003 y 2004; Tewari y col., 2006).

Para diagnosticar el grado de toxicidad causado en la planta, se suele considerar la concentración crítica del metal en los tejidos, la cual, está relacionada con el comienzo de una reducción del crecimiento (normalmente del 10%, CTC_{10%}). Las concentraciones críticas que causan toxicidad de Cu varían dentro de un amplio intervalo, dependiendo de la especie vegetal y del genotipo, así como de las condiciones ambientales. Entre los cultivos sensibles, se encuentran algunos cereales y legumbres, las espinacas, así como, las plántulas de cítricos (Kabata-Pendias y Pendias, 2000). Para muchas especies el nivel tóxico crítico de Cu en las hojas es de 20-30 mg kg⁻¹ MS, sin embargo, es muy variable el grado de tolerancia de las diferentes especies vegetales al exceso de Cu (Marschner, 1995). La toxicidad de Cu se puede corregir aumentando el contenido de m.o. y el pH mediante encalado al suelo (Aubert y Pinta, 1977).

1.11. Mecanismos de tolerancia de las plantas a dosis elevadas de Cu

La tolerancia de las plantas a los MP puede ser definida como la habilidad para sobrevivir en suelos con concentraciones que son tóxicas para otros vegetales y se manifiesta por una interacción entre un genotipo y el medio ambiente (Macnair y col., 2000). El desarrollo de tolerancia al metal puede ser feno- y genotípicamente adquirida. Las plantas superiores que muestran una tolerancia elevada a elementos traza pertenecen a las siguientes familias: Caryophyllaceae, Cruciferae, Cyperaceae, Gramineae, Leguminosae y Chenopodiaceae (Kabata-Pendias y Pendias, 2000). Las

plantas adaptadas a suelos con altos niveles de MP, muestran una resistencia específica al metal o metales, que se hallan en exceso en el medio en el que crecen. Las hiperacumuladoras son unas especies vegetales que viven en suelos ricos en MP; entre estas especies se encuentran las metalofitas, las cuales, han desarrollado mecanismos de resistencia a diversos metales. Se han identificado más de 25 especies de plantas hiperacumuladoras de Cu ([Prasad, 2004](#)). La concentración de Cu en dichas plantas oscila entre 4000-12000 mg kg⁻¹ MS ([Baker y col., 1998](#); [Reeves y Baker, 1998](#)).

La resistencia a los MP puede ser debida a dos mecanismos: i) prevención en la entrada o excreción de iones potencialmente tóxicos y ii) tolerancia a elevadas concentraciones internas, de esta manera se previene que los iones metálicos tóxicos interfieran con reacciones metabólicas sensibles ([Poschenrieder y Barceló, 2003](#)). Los mecanismos de prevención permiten mantener una baja concentración del metal en el simplasto y entre los más importantes se encuentran: exudación de sustancias a la rizosfera, inmovilización en el apoplasto, secreción, volatilización y eflujo. Mientras que los mecanismos de tolerancia permiten soportar altas concentraciones en el simplasto, entre los que se encuentran: formación de complejos con ligandos orgánicos, acumulación en vacuola y enzimas tolerantes.

A nivel externo, para reducir la absorción de MP, algunas plantas segregan HCO₃⁻ o OH⁻ que incrementan el pH en la rizosfera, esta situación se produce cuando las raíces absorben más cationes que aniones, disminuyendo de esta manera la disponibilidad de los metales. Además, las raíces pueden exudar sustancias capaces de formar complejos con los MP, de tal manera, que pueden disminuir la toxicidad. La excreción de aniones orgánicos como citrato, oxalato y malato también ha sido relacionada con la tolerancia de las plantas superiores a los metales, especialmente al Al, ya que lo complejan en la interfase suelo-raíz ([Rauser, 1999](#); [Ma y col., 2001](#)). Se ha observado que el Cu es un eficiente inductor de la exudación de ácidos orgánicos por las raíces ([Yang y col., 2001](#)), y que la adición exógena de malonato y malato alivia la toxicidad derivada de la exposición a este metal ([Parker y col., 2001](#)). La especie

Silene cucubalus (L.) Wibel tolerante al Cu, excreta una sustancia a la rizosfera, la cual se une al Cu y restringe su absorción (Jackson y col., 1990). Asimismo, las micorrizas juegan un importante papel en la resistencia de plantas al exceso de Zn y Cu, especialmente en árboles (Turnau y col., 1993).

El MP que llega a la rizodermis puede quedar retenido en la pared celular, ya que ésta se encuentra cargada negativamente, y por lo tanto, presenta una gran capacidad para adsorber cationes, siendo responsable de la resistencia al estrés por Cu, Zn y Cd en algunas especies vegetales (Mathys, 1977; Vázquez y col., 2007). A pesar de las múltiples interacciones entre los iones metálicos y la pared celular, ésta no constituye una barrera insuperable y los iones potencialmente tóxicos contactan seguidamente con el plasmalema. La membrana citoplasmática juega un papel central en el control de la absorción de MP hacia el interior de la célula, y por lo tanto, en los mecanismos de tolerancia. Una vez que los MP llegan al citosol, la planta utiliza mecanismos de complejación para detoxificarlos (Fig. 1.9). Los ligandos que utiliza son básicamente aminoácidos (histidina y cisteína), aniones orgánicos (malato, citrato, oxalato, etc.), PCs y MTs. El MP complejoado pasa a través del tonoplasto a la vacuola, en donde debido al pH, el complejo metálico se disocia, quedando el metal dentro de la vacuola y regresando el ligando al citoplasma, para volver a unirse de nuevo a otro metal. La vacuola constituye de esta forma, un orgánulo de reserva para reducir la toxicidad (Steffens, 1990). Entre los ligandos, las PCs han despertado un especial interés, presentando los diferentes iones metálicos distinta capacidad de inducir la síntesis de estas: $Cd > Cu > Zn > Mn$ (Prasad, 2004). También hay evidencias que sugieren que las MTs están implicadas en la tolerancia al Cu (Murphy y Taiz, 1995; Guo y col., 2008). En un estudio realizado sobre 10 ecotipos de *Arabidopsis* se puso de manifiesto que el nivel de inducción de las MTs por Cu, es el factor determinante del grado de tolerancia entre variedades (Murphy y Taiz, 1995). Asimismo, se ha propuesto que tanto los transportadores de membrana intracelulares (Ressing y col., 2000) como las cuprochaperonas (Harrison y col., 2000) también podrían participar en los mecanismos de tolerancia al Cu.

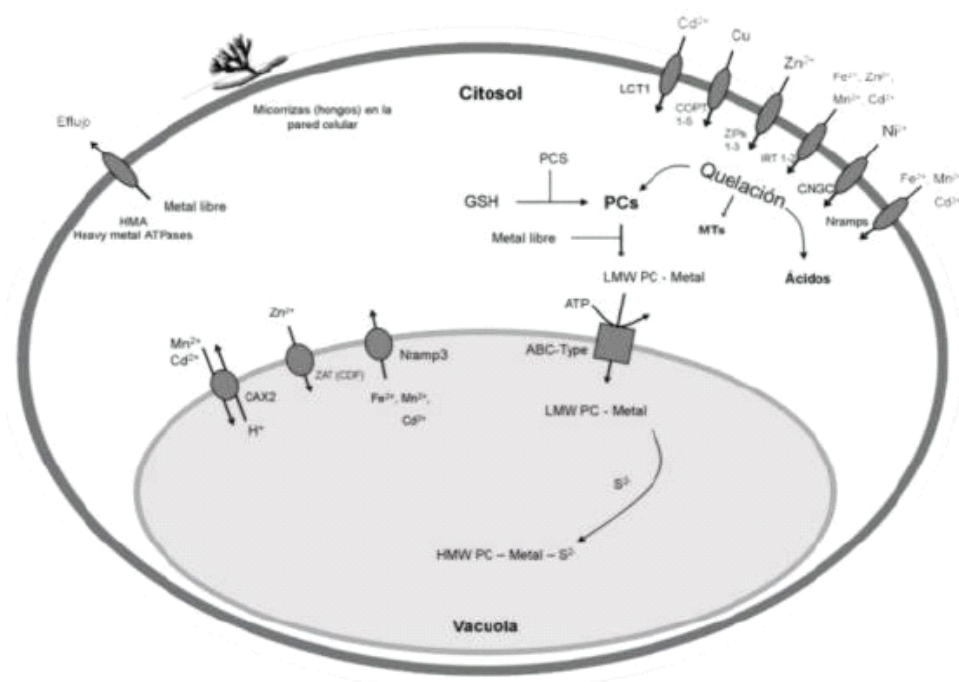


Fig. 1.9. Dinámica de los MP en la célula. Tomado de Navarro y col. (2007)

2.- Leguminosas de grano

La familia de las leguminosas con 750 géneros y 20000 especies, es la tercera más numerosa, después de las Compuestas y Orquidiáceas, y la segunda en importancia agronómica después de las gramíneas (Gepts y col., 2005). Las leguminosas se pueden clasificar en dos grupos atendiendo a su uso: forrajeras y de grano.

Las leguminosas forrajeras son las que se aprovechan sus hojas y sus tallos mediante corte o pastoreo. Sin embargo, por leguminosas grano se entienden aquellas especies pertenecientes a la familia Fabaceae, cuya utilidad primaria reside en la semilla, más que en ninguna otra parte del vegetal, si bien, en algunas especies, existen variedades en las que también es utilizable la legumbre. Entre las leguminosas de grano se encuentran garbanzo, altramuz, judía, soja, algarrobas y alberjones, guisantes, habas, almortas, lentejas, veza común, yeros y cacahuete. En general son plantas herbáceas, pero también las hay arbustivas como el guanadú. El interés

agronómico de la semilla radica en su empleo en la alimentación tanto humana como animal, debido a su elevado contenido proteico. Suministran aproximadamente el 33% del N de la dieta proteica necesario para el hombre ([Vance y col., 2000](#)) y son, en muchos países, la segunda fuente de proteínas después de los cereales. Además aportan lisina, aminoácido esencial deficiente en las proteínas de los cereales ([Mahé y col., 1994](#)). Por selección artificial también se han conseguido variedades cuyo interés económico reside fundamentalmente en su contenido graso. Asimismo, algunas leguminosas de grano también tienen importancia como forraje, abono verde, ensilado, henificado o paja. A estos usos tradicionales, se les suman otros nuevos, como cosmético y farmacéutico, fijación de taludes y restauración de suelos contaminados. Además, a sus características intrínsecas, podrían ser utilizadas como herramientas baratas y ecológicas, en las nuevas tecnologías de fitorremediación de medios contaminados.

2.1. Altramuz

2.1.1. Origen y antecedentes históricos

El altramuz es una leguminosa que se incluye entre las plantas cultivadas desde la antigüedad, su cultivo se remonta aproximadamente a unos 3000 ó 4000 años a.C. Las dos primeras especies cultivadas fueron *Lupinus albus* L., en la región mediterránea, y *Lupinus mutabilis* L. en la región Andina Central de Sudamérica.

El origen del cultivo en el Viejo Mundo, es situado por algunos autores en Egipto, aunque otros afirman que fue introducido en dicha región durante la época greco-romana ([Zhukovsky, 1929](#)). Asimismo, es probable que originalmente fuera introducido como cultivo en la antigua Grecia ([Kurlovich, 2002](#)). Posteriormente, se extendió fuera de Egipto y del Imperio Romano, llegando incluso hasta la zona meridional del Cáucaso. En Francia y probablemente en España, fue introducido por los romanos, siendo utilizado también como abono verde ([Lopez-Bellido y Fuentes, 1991](#)). El desarrollo del altramuz al norte de los Alpes y en Europa Central data de

1783, año en el que Federico II ordena su siembra en numerosas regiones de Alemania. Estos altramuces, importados de Italia no llegaban a madurar con facilidad, por lo que se emplearon como abono verde en suelos pobres y arenosos, así como, forraje verde para las ovejas. A finales del S. XIX, desciende el interés del altramuz para grano, debido a su contenido en alcaloides, aunque las especies *Lupinus luteus* L. y *Lupinus angustifolious* L. continuaron cultivándose como abono verde. La especie *L. angustifolious* L. fue introducida en Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica durante la primera mitad del presente siglo, con la finalidad de mejorar la fertilidad de los suelos (López-Bellido y Fuentes, 1991).

A partir de la Primera Guerra Mundial surge nuevamente el interés por el cultivo, debido a la escasez de alimentos proteicos, iniciándose trabajos de investigación en diversos países de Europa, Sudáfrica, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia. El alemán von Sengbush obtuvo en 1929 las primeras plantas dulces, casi libres de alcaloides. Desde entonces, ha ido aumentando el cultivo en muchas partes del mundo (López-Bellido y Fuentes, 1991).

2.1.2. Cultivo y producción del altramuz

De las numerosas especies de altramuz, sólo tres son explotadas comercialmente; *L. albus* L. (altramuz blanco), *L. angustifolius* L. (altramuz azul) y *L. luteus* L. (altramuz amarillo). Si bien, *L. consentini* L. y *L. mutabilis* L., también tienen importancia desde el punto de vista agrícola. El altramuz dulce es producido como forraje o leguminosa de grano principalmente en la ex Unión Soviética, Polonia, Alemania y el Mediterráneo, además de producirse como “rubro exportable” en Australia, para ser vendido, principalmente, al mercado europeo y asiático. La producción y el comercio mundial se concentra actualmente en este tipo de altramuz, pero existe además una proporción muy inferior, aunque nada despreciable, de variedades amargas, mayoritariamente en países del Mediterráneo, norte de África y Australia, los que son a su vez los principales representantes del comercio

internacional de este tipo de producto (unos como importadores y, en el caso de Australia, como exportador).

Las estadísticas de la FAO dan cuenta de que, a lo largo de la primera década del presente siglo, se ha producido una persistente disminución de la superficie mundial dedicada al cultivo del altramuz (Fig. 1.10). En un lapso de tan sólo nueve años, la superficie cultivada se ha reducido a menos de la mitad, cubriendo en 2008 solamente 616×10^3 ha. En esta campaña hubo un descenso del 8,2% respecto a la anterior. Aunque con fluctuaciones más amplias, que se explican por las variaciones de rendimientos, la producción mundial de altramuz muestra una tendencia en igual sentido, que se ha manifestado especialmente en los años 2006 y 2007, en particular durante este último, cuando se llegó al mínimo de 650×10^3 t producidas. En el año 2008, hubo una recuperación del 21,5% en la producción mundial, que llegó a 789×10^3 t, lo que se debió a que el rendimiento promedio mejoró un 32,3%, estableciéndose en $12,8 \times 10^5$ ha. De todos modos, esta producción equivale a sólo un 47% de las $1,7 \times 10^6$ t que se produjeron en 2005.

La distribución media de la superficie de producción entre los años 1996 y 2000 fue de aproximadamente $1,4$ a $1,5 \times 10^6$ ha, de las cuales Australia concentra un 90%. El 10% restante se reparte en más de 20 países, de los cuales sólo tres superan el 1% de la superficie mundial: Polonia (1,9 a 3,3%), Chile (1,1 a 1,2%) y España (1,0 a 1,2%). En Australia se produjo, más que en ningún otro, una trayectoria descendente de siembras y de producción. Como consecuencia de tales disminuciones, la participación australiana en el total de siembras mundiales ha bajado desde casi el 90%, a comienzos del milenio actual, a menos del 70%, en los tres años más recientes (Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias – ODEPA Ministerio de Agricultura, Chile). En España, la superficie dedicada al cultivo de altramuz ha descendido de 25.100 ha en el año 1996 a 600 en el 2008 (Tabla 1.8), siendo las principales productoras Castilla y León (Palencia y León), Extremadura (Cáceres y Badajoz) y Andalucía (Huelva; Tabla 1.9). Los rendimientos medios obtenidos han ido aumentando desde el año 1996, en cambio la producción se ha reducido en torno a

un 70% en el año 2008 con respecto a 1996. En España, la provincia de León es la que más superficie dedicó en el año 2006 al cultivo de altramuz (3202 ha), así como la que obtuvo un mayor rendimiento (2400 kg ha^{-1}) y producción de grano (3613 t).

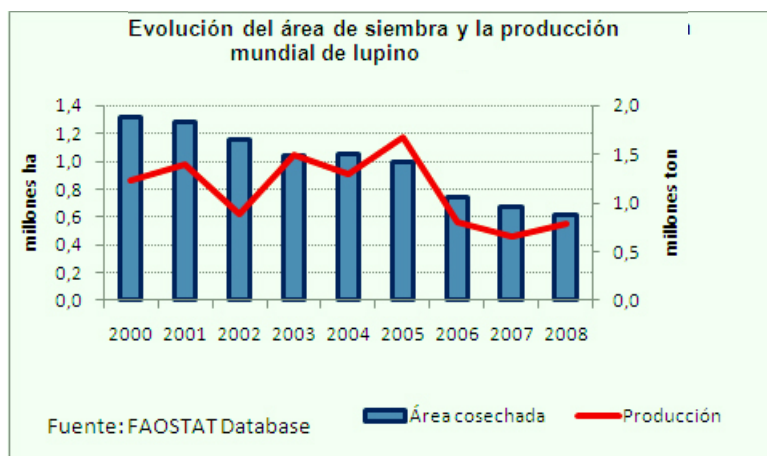


Fig. 1.10. Evolución de la superficie de siembra y la producción mundial de altramuz. Tomado de la FAO (2008)

Tabla 1.8. Superficie de cultivo, rendimiento, producción de altramuz en España

	Año						
	1996	1998	2000	2002	2004	2006	2008
Altramuz							
Superficie de cultivo (ha)	25100	14100	15429	17479	15563	9705	600
Rendimiento (kg ha^{-1})	6932	7517	8086	6766	6530	7315	8666
Producción (t)	17400	10600	12476	11827	10163	7100	5200
Precio medio percibido por agricultor (euros/100 kg)	26,7	23,1	18,8	17,8	19,5	20,2	---
Valor (Euros)	4643	2467	2348	2106	1979	1432	---
Datos de la FAO y del Anuario de Estadística Agroalimentaria							

Tabla 1.9. Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción del año 2006

Altramuz	Superficie (ha)			Rendimiento (kg ha^{-1})		Producción grano
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío	Toneladas
Comunidades Autónomas y Total						
Cataluña	1	-	1	1000	-	1
Baleares	2	-	2	650	-	1
Castilla y León	4332	1462	5794	502	1655	4595
Castilla la Mancha	111	8	119	537	1144	70
Extremadura	2933	-	2933	549	-	1612
Andalucía	595	171	766	854	1409	749
Canarias	90	-	90	800	-	72
España	8064	1641	9705	549	1627	7100
Datos del Anuario de Estadística Agroalimentaria						

2.1.3. Botánica y fisiología del altramuz

➤ *Morfología y características de la planta*

El altramuz es una leguminosa perteneciente al género *Lupinus*, subfamilia Faboideae, familia Fabaceae, orden Fabales, clase Rosiidae (Takhatajan, 1996). Las distintas especies del género *Lupinus* pueden ser anuales o perennes, de tipo herbáceo o arbustivo, y con porte erecto, semirrecto o rastrero. El sistema radicular es pivotante, fuerte y profundo. Además, presenta múltiples ramificaciones, raicillas y pelos radicales que se originan principalmente en el cuello de la raíz. El tallo es ramificado, gabro o pubescente, pudiendo alcanzar hasta 2 m de altura. Las ramificaciones laterales pueden ser de hasta un quinto orden. En cuanto a las hojas, son digitadas, con un largo pecíolo y con 5 o 12 folíolos ovoides o lanceolados en función de la especie y pelosos por el haz y el envés. Su coloración varía desde el verde intenso de *L. albus* L., hasta tonalidades verdes amarillentas en *L. anfastifolius* L. y *L. mutabilis* L.

Las inflorescencias aparecen en racimo terminal del tallo principal y de las demás ramas, variando de tamaño y número a medida que avanza en el orden de las ramas. Las flores son típicas de las Papilionáceas, con simetría bilateral y pétalos desiguales (Figs. 1.11 y 1.12). La fecundación es básicamente autógama, si bien también existe la alogamia, dependiendo del porcentaje de las diferentes especies y condiciones climáticas de la zona. El porcentaje de cuajado de las vainas es variable en las distintas inflorescencias de la planta, según el orden de ramas al que pertenezcan y en función de las condiciones ambientales, estando comprendido entre un 10-30% (López-Bellido y Fuentes, 1991). Cada vaina puede contener hasta 9 semillas, aunque normalmente tiene entre 3 y 6. Las semillas presentan formas, tamaños y coloraciones muy variadas (Fig. 1.11). Los granos de mayor tamaño los presenta *L. albus* L., (240-600 g/1000 semillas); para las otras tres se dan valores de 125-340 (*L. mutabilis* L.), 130-200 (*L. anfastifolius* L.) y 80-180 (*L. luteus* L.).

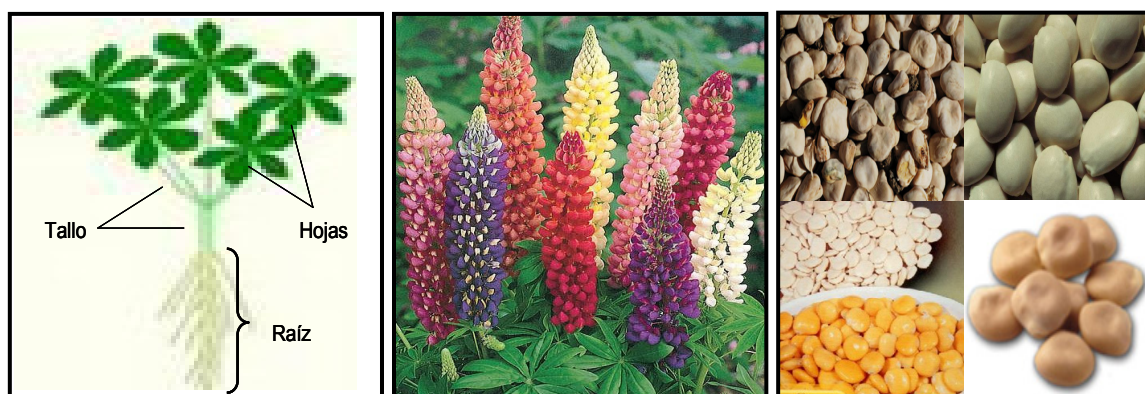


Fig. 1.11. Morfología de la planta (izda.), inflorescencias (centro) y distintos tipos de semillas (dcha.)



Fig. 1.12. Aspecto de las inflorescencias de las especies *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* y *L. mutabilis*

➤ Variedades y clasificación

Del género *Lupinus* existen más de trescientas especies, de las que destacamos sólo cinco por su importancia desde el punto de vista agrícola: *L. albus* L., *L. angustifolius* L., *L. luteus* L., *L. consentini* L. y *L. mutabilis* L. De acuerdo al contenido de alcaloides presentes en el grano, existe una categorización: dulce (hasta 0,05%), semi-dulce (0,05-0,15%); semi-amargo (0,15-0,30%) y amargo (> 0,30%). Dentro de cada especie de *Lupinus* se pueden encontrar diversas variedades. En la **Tabla 1.10** aparecen reflejadas distintas variedades de *L. albus* L., *L. angustifolius* L. y *L. luteus* L.

Tabla 1.10. Variedades de las especies *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*

	Variedades		
	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. luteus</i>
<i>Lupinus</i>	Adam	Arabella	Acos
	Alban	Azuaga	Alburquerque
	Alcas	Azuro	Barpine
	Amiga	Baron	Bornal
	Arès	Beleña	Cardiga
	Arthur	Bojar	Dukat
	Aster	Boltensia	Jabato
	Balkányi	Bora	Juno
	Boros	Boregine	Kroton
	Butan	Borlu	Kurzeme
	Clovis	Boruta	Lord
	Detty	Cezar	Markiz
	Dieta	Charra	Mister
	Energy	Elf	Parys
	Estoril	Galant	Perkoz
	Feodora	Graf	Polo
	Fortuna	Haagena	Pootallong
	Lublanc	Haags Blaue	Talar
	Ludic	Kalif	Taper
	Lugain	Karo	Trebisa
	Lumen	Kubesa	Vega
	Lustral	Mirela	Vegus
	Lutteur	Neptun	Wodjil
	Luxe	Prima	
	Marta	Probor	
	Multitalia	Regent	
	Nelly	Rose	
	Nyírségi keserű	Rubesta	
	Tormes	Sanabor	
	Vajai 1	Sonate	
	Volos	Sonet	
	Zulika	Stevens	
		VB Derliai	
		VB Ugniai	
		VB Vilniai	
		Viol	
		Vitabor	
		Wersal	
		Zapaton	
		Zeus	
Catálogo común de variedades de especies de plantas agrícolas (2009/C 302 A/01)			

➤ *Ciclos y periodos del crecimiento del altramu*

Se suelen distinguir cinco fases en el desarrollo de la planta:

Siembra-emergencia: Su duración depende de la temperatura y de la especie de que se trate. Dicho periodo se reduce cuando las temperaturas son altas, mostrando *L.*

albus L. un periodo más corto que *L. luteus* L. y éste a su vez, más corto que *L. angustifolious* L. (Nadal y col., 2004).

Emergencia-iniciación floral: Esta fase depende de las necesidades de vernalización, que a su vez depende tanto de la especie como de la variedad de que se trate y de la temperatura, una vez cubiertas las necesidades de vernalización. En las condiciones mediterráneas, *L. albus* L. y *L. mutabilis* L. son los primeros en florecer y *L. angustifolius* L. el último. Esta variación en el tiempo de comienzo de la floración, es debido, a una mayor necesidad de vernalización de esta última especie.

Iniciación floral-comienzo de la floración: La temperatura es un factor clave en la duración de este periodo, por lo que si se retrasa la siembra, dicho periodo se acorta.

Floración: La aparición de las inflorescencias de un determinado orden de ramas coincide con la floración del orden inmediatamente anterior. El periodo de floración en cada inflorescencia es más corto a medida que el orden de la misma es superior. El número de las órdenes de ramificación con flores es variable en función de las condiciones ambientales que determinan el final de la floración, como altas temperaturas, mayor radiación y fotoperiodo, así como, el déficit hídrico (López-Bellido y Fuentes, 1991). Durante la fase de floración se produce una competencia por los nutrientes entre los nuevos órdenes de las ramas, el crecimiento vegetativo y las inflorescencias, así como las ramas ya existentes, lo que causa un bajo porcentaje de cuajado y un lento crecimiento inicial de las vainas (López-Bellido y Fuentes, 1991).

Maduración: Al final de la floración disminuye el crecimiento vegetativo y tiene lugar la caída progresiva de las hojas a la vez que se produce un rápido crecimiento de los granos, de forma casi simultánea, en todos los órdenes de las ramas, a costa de la fotosíntesis de las hojas verdes restantes y de la actividad fotosintética de las vainas, así como de la migración de nutrientes desde las ramas y hojas senescentes (López-Bellido y Fuentes, 1991).

2.1.4. Exigencias ambientales

El altramuz es una planta de amplia adaptación climática, con requerimientos térmicos variables según especies y variedades. Se desarrollan bien a temperaturas comprendidas entre los 10-14°C, con crecimiento óptimo a temperaturas diurnas comprendidas entre 20-25°C, afectando negativamente temperaturas superiores a 28°C y manifestando el cero vegetativo a 3-4°C (Nadal y col., 2004). Las temperaturas elevadas acompañadas de estrés hídrico, pueden afectar al crecimiento, sobre todo durante la floración y el cuajado de las vainas. El clima idóneo para el crecimiento de *L. albus* se caracteriza por temperaturas frías a moderadamente cálidas (López-Bellido y Fuentes, 1991).

Las necesidades hídricas son elevadas y variables según la especie y la fase de crecimiento, sin embargo presenta cierta resistencia a la sequía, debido a la profundidad de su sistema radicular, que explora un gran volumen del suelo. En general, necesita una mayor cantidad de agua durante la formación de las flores y el cuajado de las vainas (López-Bellido y Fuentes, 1991).

Los mejores suelos para su cultivo son los profundos, fértiles, moderadamente ácidos o ligeramente calizos y bien drenados (Nelson y col., 1983). Son limitantes para el altramuz, los suelos con un alto contenido en cal y valores elevados de pH, presentando clorosis y problemas de crecimiento. Existen entre especies, notables diferencias en cuanto a su sensibilidad a la presencia de caliza en el suelo: *L. luteus* > *L. angustifolius* > *L. mutabilis* > *L. albus*. Se admiten como límites para el cultivo de las diferentes especies, los suelos con contenidos de CaCO₃ > a 3-5% en *L. albus*, 0,5-1% en *L. angustifolius* y 0,5% en *L. luteus* (López-Bellido y Fuentes, 1991). El altramuz blanco prefiere suelos con contenidos medios en arcillas y pH ≈ 6; el azul, suelos más francos que los anteriores y pH ácidos, y el amarillo, suelos arenosos con pH ≈ 4,5 (Nadal y col., 2004).

2.1.5. Técnicas de cultivo

➤ *Fertilización del altramu*

Tradicionalmente el cultivo no se ha abonado, especialmente con enmiendas nitrogenadas, pensando que es suficiente el N que aporta el *Rizobium*. Aunque normalmente lo es, el aporte de 20-30 unidades fertilizantes de N en abonado de fondo es positivo para el buen establecimiento de cultivo, hasta que empiece la fijación por parte del microsimbionte (Nadal y col., 2004).

El cultivo responde bien al abonado fosfórico y potásico, recomendándose de 10-60 unidades/ha de P_2O_5 y 100-120 unidades/ha de K_2O (Nadal y col., 2004). Una dosis alta de superfosfato y abono potásico, aplicada cerca de la semilla, puede afectar a la emergencia de las plantas, por ser la semilla bastante sensible a la concentración de sales. En el caso del superfosfato, puede reducir la absorción de K o Mn y según algunos estudios realizados sobre la nutrición potásica del altramu, esta leguminosa se muestra sensible a la deficiencia de K y menos eficiente en la extracción de K del suelo que los cereales (Cox, 1978).

El altramu puede responder favorablemente al abonado de S en forma de $CaSO_4$, K_2SO_4 , $MgSO_4$ o superfosfato simple (López-Bellido y Fuentes, 1991). Los niveles de Cu, Zn y Mo necesarios para altramu son semejantes a los del trigo. La especie *L. angustifolius* es sensible a la deficiencia de Mn en el suelo, debido a que produce la rotura de la cubierta seminal y reduce el rendimiento.

➤ *Siembra y germinación*

Numerosos autores recomiendan que la siembra sea temprana tanto en otoño como en primavera. En general, el adelanto de la siembra es más importante en primavera, no debiéndose hacer después de mediados de marzo. La fecha de siembra de otoño es menos crítica pero debe hacerse entre octubre y noviembre (López-Bellido y Fuentes, 1991). Además es aconsejable la siembra en seco, antes de las

primeras lluvias otoñales, aunque ello implique hacer un tratamiento herbicida. Cuando se siembra a partir de diciembre, los rendimientos obtenidos son normalmente inferiores. Los ensayos de siembra con *L. albus* realizados durante cinco años en Andalucía, han puesto de manifiesto la conveniencia de la siembra temprana en otoño, ya que su retraso acorta el periodo de crecimiento del cultivo, la duración de la floración y esto se traduce en un número menor de vainas (López-Bellido y Fuentes, 1991).

Se recomienda una siembra poco profunda, entre 1-5 cm, por tratarse de una especie con germinación epigea, con emergencia de los cotiledones, la cual se ve dificultada a mayor profundidad. Asimismo, se recomiendan densidades de plantación comprendidas entre 25-80 plantas m⁻² en *L. albus*. La distribución de la semilla se hace habitualmente en surcos y la distancia entre surcos puede oscilar entre 15-70 cm. Las semillas germinan bien con porcentajes bajos de humedad.

➤ *Recolección y conservación*

La recolección de grano se puede realizar con una cosechadora de cereales, siendo recomendable hacerla a primera hora de la mañana, con el fin de reducir la dehiscencia de las vainas. Si el destino es para forraje verde, la recolección se realiza cuando se ha terminado la floración de los tallos terminales y comienza la ramificación lateral (Nadal y col., 2004). El almacenamiento de los granos se realiza en lugares secos y ventilados, en los que se pueda llegar a valores de 8-10% de humedad relativa (Nadal y col., 2004).

2.1.6. Plagas y enfermedades

La diversidad ecológica de las áreas en las que se cultiva el altramuza, da lugar a una amplia gama de parásitos que pueden atacar a la planta, en función de la utilización comercial de la cosecha y de las prácticas culturales. Además, las plagas y enfermedades varían según la especie de altramuza que se trate y el que la variedad sea dulce o amarga.

Respecto a las plagas, diversas especies de *Helioyhos sp.*, causan daños importantes en brotes, flores y vainas. Asimismo, hay insectos del suelo que atacan a las plántulas, como los barrenadores y minadores de tallos, brotes y hojas, así como vertebrados que causan daños en la emergencia y en la fase vegetativa. Las principales plagas citadas en España son *Phorbia platura*, que ataca a la fase de germinación y emergencia y *Sitona sp.*, cuyas larvas destruyen los nódulos.

En cuanto a las enfermedades, *Pleiochaeta setosa* (mancha marrón de la hoja) y *Colletotrichum gloeosporoides* (antracnosis), son las más extendidas y de mayor gravedad. Además, se puede destacar *Fusarium sp.*, *Pythium sp.*, *Rizoctonia sp.* (pochedumbre de la raíz) y *Stemphylium vesicarium* (mancha gris de la hoja). *Pleiochaeta setosa* causa una defoliación durante el crecimiento inicial de la planta y en el periodo de prefloración, pudiendo llegar a destruir por completo el cultivo. Por último, el oidio produce manchas blancas y provoca la paralización del crecimiento de las plantas, tardando en madurar las vainas afectadas.

2.1.7. Características nutricionales

Diversos estudios señalan la importancia de esta leguminosa por su alto contenido de proteína en la planta y principalmente en el grano (Villagra, 1996). Se considera que constituye la fibra vegetal con mayor índice proteico y la más barata de producir (Agroanálisis, 1995); conteniendo según especie y variedad, entre el 30-50% de proteína. Se ha comprobado que la falta de agua durante la fase de llenado del grano puede disminuir el nivel de N en el mismo (López-Bellido y Fuentes, 1991).

El problema nutricional ampliamente reconocido de la semilla de altramuza es su bajo contenido en aminoácidos azufrados, especialmente de metionina y lisina, y también de valina y triptófano, lo que se presenta tanto en las variedades dulces como amargas. Pero el aminoácido limitante sería solamente la metionina, considerando a la lisina con una concentración adecuada (Rios, 2000).

En general, las semillas de altramuz son ricas en aceites, esto hace que no sólo sean interesantes como base de proteínas, sino también como alimentos energéticos. La energía que posea el grano, depende básicamente de que sea una variedad de invierno o de primavera, esto conlleva a que se tengan valores de energía metabolizable desde 2990 a 3500 Kcal kg⁻¹, variando entre 2991 y 3280 Kcal kg⁻¹ para *L. albus* (Gädicke, 1996). Las temperaturas altas y los elevados niveles de N en el suelo durante el desarrollo del grano, reducen el contenido de grasa del mismo (López-Bellido y Fuentes, 1991). El contenido de aceite es bastante alto, comparando con otros cultivos, variando según la especie entre 5-18%. Se ha comprobado que los ácidos grasos insaturados son los que se encuentran en mayor proporción y de éstos principalmente el ácido oleico, si bien, también presentan un alto contenido de ácido linoléico (Rios, 2000). El contenido de hidratos de carbono varía entre 20-30%. La proporción de almidón es baja y los glúcidos restantes tienen baja digestibilidad. Entre ellos destaca la celulosa, que puede superar el 10% del peso de la semilla en las especies de grano pequeño como *L. angustifolius* y *L. luteus*, debido a su mayor proporción de tegumentos (López-Bellido y Fuentes, 1991).

La semilla de altramuz puede contener niveles máximos promedios de 0,3% de Ca, 0,17% de Mg, 0,6% de P, 1,1% de K y 1% de Na (López-Bellido y Fuentes, 1991). Los valores de fibra cruda son más bien altos, con un 16,8% y 17,6% para *L. angustifolius* y *L. luteus*, respectivamente (Tabla 1.11).

A su vez, las semillas de esta leguminosa también tienen antinutrientes que disminuyen considerablemente su valor alimenticio. Entre estas sustancias destacan los alcaloides quinolizidínicos, tóxicos y amargos (lupina, lupanina, esparteína e hidroxilupanina). El contenido varía entre 0,3% hasta más de un 3% en las semillas de altramuz amargo, mientras que en las líneas dulces se encuentra entre 0,02 - 0,05% (López-Bellido y Fuentes, 1991).

Tabla 1.11. Composición de la semilla de altramu

Altramuz	% sobre materia seca			
Especie	Proteínas	Extracto etéreo	Fibra cruda	Cenizas
<i>L. albus</i> L.	30 - 48	9,9-14,5	3,3-10,0	2,9-4,7
<i>L. angustifolius</i> L.	30 - 40	5,3-6,6	13,0-16,8	2,4-3,9
<i>L. luteus</i> L.	32 - 48	4,0-7,1	14,6-17,6	4,0-5,9
<i>L. mutabilis</i> L.	40 - 50	13,1-23,1	7,4-11,3	3,0-4,5
Adaptado de López-Bellido y Fuentes (1991) y Nadal y col. (2004)				

2.2. Soja

2.2.1. Origen y antecedentes históricos

Se considera que la soja es originaria de las provincias del noreste de China y de la Manchuria. La cita más antigua del cultivo de soja parece estar contenida en el Pen Ts'ao Kang Mu del emperador Shen Nung, cuya fecha de publicación se remonta al año 2838 a.C., aunque parece ser que ya fue conocida y cultivada en épocas anteriores, como aparece en las inscripciones en bronce y en las pinturas arcaicas chinas. A partir del siglo II a.C., fue introducida en Corea y Japón donde habría llegado también de la parte central de China. La soja es considerada como una planta esencial para la civilización china, siendo el cultivo más importante junto con el arroz, trigo, cebada y mijo. Hasta la guerra entre China y Japón (1894-1895) la producción estaba localizada sobre todo en China y sólo más tarde Japón comenzó a importar derivados de soja, pero para usarlos como fertilizantes.

En Estados Unidos, la soja es citada por primera vez en la bibliografía en 1804 y desde entonces empieza a ser utilizada en varios estados. Es a finales del siglo XIX cuando la planta comienza a ser estudiada de un modo completo, considerándose sobre todo su aspecto forrajero. En 1940 son clasificadas 280 variedades, obtenidas de China, Japón, India, Liberia, Manchuria, Corea, Taiwán, Java y algunas de Europa. Sólo 15 años después son introducidas en EE.UU. más de 700 variedades, aumentando tanto, que superaron las 15.000 a finales de los años setenta. El cultivo empieza a extenderse desde 1930 como planta forrajera para la alimentación de cerdos y ganado ovino, pero también será utilizada como abono verde.

En Europa, el interés por el cultivo de la soja comienza a principios de 1900 después de la guerra ruso-japonesa, pero ya anteriormente en el Jardín Botánico de París (1740) y en el Jardín Real de Kew (Inglaterra) habían sido cultivadas semillas traídas por los misioneros desde China. A principios del S. XX, se realizan las primeras importaciones en Inglaterra, Alemania y Holanda como alimento “sin almidón” para diabéticos. También para la producción de alimentos especiales, la fabricación de jabones y más tarde para la alimentación del ganado. Posteriormente, otros países europeos comienzan a interesarse por los productos obtenidos de la soja, pero el cultivo no logra afianzarse.

A partir de 1920, en Europa y América, se empieza a valorar la importante utilización de la planta como suministradora al mismo tiempo de aceite y proteínas. La disponibilidad de mejores variedades y la puesta a punto de una técnica de cultivo más adecuada permiten una fuerte expansión de la superficie cultivada y una mejora substancial de la producción.

2.2.2. Cultivo y producción de soja

A nivel mundial, la soja es el principal cultivo oleaginoso (54%), seguido con diferencia por la colza (22%) y el girasol (7%). En la campaña 2007/08, la superficie mundial descendió un 6% respecto a la anterior; siendo más notorio en EE.UU., primer productor del mundo, donde lo hizo en un 15% a favor, principalmente, del cultivo del maíz. Igualmente también ha afectado a China y a los países de la CEI (Comunidad de Estados Independientes) que de forma global han frenado la superficie de cultivo de oleaginosas, a favor de los cereales. Del total de esta superficie $57,5 \times 10^6$ ha corresponden a soja transgénica, siendo de $56,8 \times 10^6$ ha en la campaña pasada. En los principales países productores del mundo como EE.UU., la soja transgénica representa el 91% de la superficie cultivada y en Argentina el 99%. En la campaña 2008/09, aumentó la superficie de siembra en 43×10^6 ha, es decir en un 6-7% más, respecto a la anterior en los países de América del Sur, siendo Brasil el que experimenta un crecimiento mayor de la producción.

La producción mundial de semillas de oleaginosas en la campaña 2007/08 alcanzó los 393×10^6 t; lo que representa un descenso de 14×10^6 t, de las cuales 8×10^6 t corresponden a la soja. Según los datos recogidos, EE.UU. ocupa el primer lugar con más de 70×10^6 t, seguido de Brasil con 61×10^6 t y Argentina con 47×10^6 t, en su conjunto estos tres países representan el 81% de la producción mundial ([Fig. 1.13](#)). La producción de soja en la UE sólo representa un 4% del total de las oleaginosas cultivadas; muy lejos de la producción de colza con el 73% y del girasol con el 19%. En la campaña 2008/09, Italia ocupa el primer lugar seguido de Rumania, Francia y Hungría.

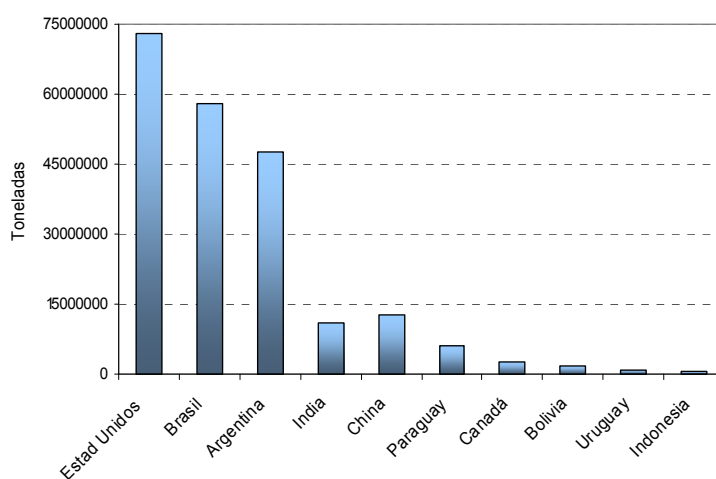


Fig. 1.13. Producción mundial de soja según datos recientes de la FAO

En España se han llevado a cabo numerosos intentos para fomentar el cultivo de soja. Tras sucesivas etapas donde se ha alternado la indiferencia y el interés, se llega al momento actual, donde la máxima superficie cultivada no ha superado las 200 ha, siendo las Comunidades Autónomas de Extremadura y Castilla y León las de mayor importancia ([Tabla 1.12](#)). Las elevadas necesidades hídricas del cultivo parecen ser las principales causas de la reducida expansión del cultivo, aunque para el agricultor español también es determinante, los bajos rendimientos de grano, comparados con los de otros cultivos como maíz, algodón, remolacha, etc. ([López-Bellido, 2002](#)). Los rendimientos medios obtenidos han ido aumentando desde el año 1996, en cambio, la producción se ha reducido en el año 2008 en torno a un 96%, con

respecto al año 1996 (Tabla 1.13). Cáceres y Badajoz son las provincias que más superficie han dedicado al cultivo de soja en el año 2006 con 130 y 102 ha, respectivamente y las que obtuvieron un mayor rendimiento (3000 y 3100 kg ha^{-1}) y producción de grano (306 y 403 t).

Tabla 1.12. Resumen de datos de superficie, rendimiento y producción de soja del año 2006

Soja	Superficie (ha)			Rendimiento (kg ha^{-1})		Producción grano
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío	Toneladas
Comunidades Autónomas y total						
Navarra	-	21	21	-	2000	42
La Rioja	-	8	8	-	2000	16
Aragón	-	81	81	-	2094	170
Cataluña	14	-	14	2214	-	31
Castilla y León	35	81	116	1479	2.583	261
Castilla la Mancha	-	76	76	-	2009	152
Extremadura	-	232	232	-	3056	709
Andalucía	17	65	82	850	1900	138
España	66	564	630	1483	2521	1519
Datos del Anuario de Estadística Agroalimentaria						

Tabla 1.13. Superficie de cultivo, rendimiento, producción de soja en España

Soja	Año						
	1996	1998	2000	2002	2004	2006	2008
Superficie de cultivo (ha)	5137	5499	3053	600	148	630	200
Rendimiento (kg ha^{-1})	19741	20731	21870	26666	26621	24111	20000
Producción (t)	10141	11400	6677	1600	394	1519	400
Precio medio percibido por agricultor (euros/100 kg)	18,23	18,64	21,32	18,72	23,60	21,37	---
Valor (Euros)	1849	2132	1423	301	93	325	---
Datos de la FAO y Anuario de Estadística Agroalimentaria							

2.2.3. Botánica y fisiología de la soja

➤ *Morfología y características de la planta*

La especie *Glycine max* (L.) Merr. pertenece al orden Rosales, familia Papilionaceae o Fabaceae, subfamilia Papilionoideae, tribu Phaseoleae, género

Glycine. El género *Glycine*, según algunas clasificaciones, está dividido en tres subgéneros: *Glycine* Willd, *Bracteata* Verdc., y *Soja* Moench; comprendiendo cada uno varias especies. El subgénero soja incluye las especies *Glycine max* y *Glycine ussuriensis*, además de una forma intermedia *Glycine gracilis* (Venturi y Amaducci, 1988).

La soja es una planta anual de primavera-verano de porte erecto con o sin ramificaciones, de altura variable entre 50 y 180 cm, con un sistema radicular extendido, débilmente pivotante y con una abundante superficie foliar. El sistema radicular está formado por una raíz principal, por numerosas raíces secundarias que salen de la principal y son más delgadas que ésta, así como por numerosas raíces adventicias. La mayor parte del sistema radicular está representado por las raíces secundarias que se desarrollan en los primeros 10-15 cm de la raíz principal. Se extienden horizontalmente hasta una distancia de 40-70 cm y después se doblan hacia abajo, alcanzando una profundidad de hasta 180 cm.

El tallo se encuentra recubierto por una pelusa de color pardo grisácea muy fina y espesa. Cuando el desarrollo de la soja es determinado, el tallo principal es más corto y termina en un largo racimo formado por muchas vainas y al llegar a esa altura finaliza el crecimiento, o bien queda muy reducido después de la floración. Estos tipos tienden a tener un número limitado de entrenudos (6 a 8). Las variedades indeterminadas, por el contrario, después del comienzo de la floración pueden continuar creciendo hasta la altura de maduración y alcanzar un porte superior (2 a 4 veces), caracterizándose por un tallo más alto y fino, con menor número de vainas en la zona apical del mismo. El número de entrenudos puede ser a su vez más elevado (14-26) y la yema apical sigue su desarrollo durante la mayor parte del ciclo y por tanto, no presenta un racimo terminal.

Las hojas son de cuatro tipos: dos cotiledonales, dos simples (unifoliadas), las trifoliadas y los profilos. Las hojas cotiledóneas son de forma semicircular, tienen estomas sobre ambas caras y su función es la de reserva. Las dos unifoliadas, que se encuentran opuestas, salen del nudo inmediatamente superior al de las cotiledóneas.

Tienen forma ovalada y pecíolos largos de 1 ó 2 cm. Las hojas que se forman posteriormente son las trifoliadas, alternas y dispuestas de manera dística. Los foliolos tienen un borde entero y forma variable, de alargada a oval, o de forma de lanza. El cuarto tipo de hojas, los profilos, son muy pequeñas y se encuentran situadas en la base de cada una de las ramificaciones laterales sin el pecíolo y el pulvino (Fig. 1.14). Las hojas, tallos, sépalos y vainas se caracterizan tener una espesa vellosidad, con gran variabilidad de color, forma, tamaño y densidad de los pelos.

Las flores son de color blanco o violeta (Fig. 1.14). En las variedades indeterminadas, las inflorescencias son racimos axiales que producen vainas distribuidas bastante uniformemente sobre el tallo y las ramificaciones. En las variedades determinadas, son menos espesas hacia la parte apical; axilar y terminales. Las inflorescencias están constituidas por 2-35 flores; las primeras en los tipos indeterminados, aparecen normalmente entre el cuarto o quinto nudo y, sucesivamente, la floración progresa hacia la parte apical del tallo y de las ramificaciones. En los tipos determinados, la floración comienza casi simultáneamente en todos los nudos.



Fig. 1.14. Morfología de la planta de soja (izda.) e inflorescencia (centro y dcha.)

Cada inflorescencia puede proporcionar de 1 a más de 20 vainas y, en teoría, se podrían tener más de 300 vainas por planta. Las vainas presentan un tamaño de 2-7 cm, aparecen ligeramente curvadas o a veces rectas y son vellosas de color verde

virando hacia el amarillo durante la maduración. Una vaina puede tener de 1-5 semillas, sin embargo en condiciones normales de cultivo, lo normal es que tengan de 2 a 3. La semilla tiene forma, color y dimensiones muy variables: generalmente redondeada, también puede ser ovalada, más o menos aplastada, de color pajizo, aunque también verde, gris, parda, negra, bicolor o variegada y de peso variable entre 50 y más de 400 mg (Fig. 1.15).



Fig. 1.15. Distintos tipos de semillas de soja. Tomado de Mateos-Aparicio (2008)

➤ *Variedades y clasificación*

En EE.UU., las variedades de soja se clasifican en diez grupos en función de su madurez y la duración de su ciclo vegetativo, numerados desde el 00 hasta VIII (Tabla 1.14). La soja es una planta cuya floración está íntimamente ligada con la duración del día. Por ello, además de las condiciones de temperatura, humedad y suelo, habrá que considerar la duración del fotoperiodo de la zona geográfica elegida, para la siembra de cada variedad. Existen más de tres mil variedades de soja, con ciclos vegetativos que fluctúan desde los 90 hasta cerca de los 200 días y con diferentes exigencias en cuanto a la duración del hemeroperíodo.

Para el sur de España, se recomienda variedades de ciclo corto, escapando así de las posibles lluvias del otoño que puedan perjudicar a la maduración del grano (Nadal y col., 2004). Las variedades que más se cultivan en España, son Akashi, Amsoy, Azzurra, Calland, Canton, Gallarda, Katai, Panter y Williams. Las cuales están

englobadas en los grupos 0, I, II y III de latitudes septentrionales, ya que España, exceptuando las Islas Canarias, se encuentra entre los 36 y 45º de latitud norte. Estos grupos son los que mejor se adaptan en ciclo y rendimiento a las condiciones mediterráneas. En el centro y sur de la Península Ibérica, los grupos II y III son los más apropiados (López-Bellido, 2002).

Tabla 1.14. Variedades comerciales de soja

Soja		
Grupo	Variedades	Ciclo vegetativo (días)
00	Portage	90-95
0	Merit, Traverse	105-110
I	Chippewa 64, Hark, Wirth	112-118
II	Harosoy 63, Lindarin 63, Amsoy, Corsoy, Beeson	122-128
III	Shelby, Wayne, Williams	132-135
IV	Clark 63, Kent, Cutler, Calland	137-147
V	Hill, Dare	152-163
VI	Lee	168-175
VII	Bragg	178-188
VIII	Hampton, Hardee	190-195
Tomado de MAPA (1973) y Nadal y col. (2004)		

➤ Ciclos y periodos del crecimiento de la soja

Se suelen distinguir cinco fases en el desarrollo de la planta:

Germinación, emergencia y primeras fases vegetativas: Cuando la cantidad de agua absorbida alcanza valores correspondientes al 50% del peso de la semilla y si la temperatura es adecuada, la radícula sale rápidamente (24-48 h) del tegumento seminal y se desarrolla. A continuación, el hipocótilo se alarga rápidamente y forma un arco muy curvo en cuya extremidad están los cotiledones. En el momento en el que los cotiledones emergen del suelo, el hipocótilo se endereza y la plántula progresa con el desarrollo de éste y de las hojas unifoliadas, que en pocos días completan su formación (Fig. 1.16). Además, sobre el tallo aparecen también las yemas latentes (Venturi y Amaducci, 1988).

Desarrollo y crecimiento vegetativo: La duración del periodo vegetativo está influenciada por las características de cada variedad. Como consecuencia de siembras precoces, por tanto de temperaturas bajas, se alarga el periodo vegetativo y las plantas presentan normalmente un mayor número de entrenudos y más cortos. Por el contrario, una abundante disponibilidad hídrica, riegos precoces, elevadas densidades de siembra y la presencia de malas hierbas provocan entrenudos más largos. Si bien, esto puede favorecer el encamado, creando dificultades para la maduración. Con siembras más tardías, aparecerán menos entrenudos, debido al breve periodo vegetativo; pero cada uno será más largo, en función de las temperaturas más elevadas (Venturi y Amaducci, 1988).



Fig. 1.16. Germinación y emergencia de la planta de soja. Tomado de http://agro.uncor.edu/~ceryol/documentos/soja/feno_soja.pdf

Asimismo, el número de ramificaciones está muy influido por la luz, siendo menor en cultivos muy espesos y muy infectados por malas hierbas, y por el contrario, superior en condiciones opuestas. A igualdad de época de siembra, las variedades precoces alcanzan una menor altura con respecto a las tardías. Además en cultivos de soja con bajas densidades de siembra, se reduce la producción por planta, ya que pierde parte de la radiación incidente y puede haber problemas con el control de las malas hierbas.

Floración: Se manifiesta de manera muy escalonada, con gran superposición entre los periodos vegetativos y reproductivos. La modalidad de la floración es diferente para

las variedades determinadas e indeterminadas. En las primeras, el desarrollo reproductivo comienza cuando se ha cumplido la mayor parte del crecimiento vegetativo. En las variedades indeterminadas, las fases vegetativas y reproductivas se superponen. El número de flores por racimo también varía, según la variedad y la posición que ocupe sobre el eje principal o sobre sus ramificaciones, estando también afectadas por la temperatura y la disponibilidad hídrica ([Venturi y Amaducci, 1988](#)).

Formación y llenado de las vainas: La formación de las vainas comienza a partir de las primeras flores, que aparecen a los 7-15 días del comienzo de la floración; el proceso de formación se completa en 20 días. El crecimiento y el llenado de la vaina es al principio lento, haciéndose más rápido cuando termina la floración. Esta fase es la más delicada del cultivo. Durante este periodo, la planta deberá disponer de una adecuada cantidad de nutrientes, puesto que en esta fase absorbe casi el 60% de sus necesidades de N y P y el 70% de K ([Venturi y Amaducci, 1988](#)).

Maduración: Esta fase puede dividirse en fisiológica y de recolección. La primera se alcanza cuando termina la acumulación de materia seca. Se puede apreciar por la pérdida de color verde de las vainas y de humedad, pasando de un 80% a un 60%. Después de la maduración fisiológica, pierden más agua hasta alcanzar una humedad del 10-15%. En este periodo las vainas se oscurecen, las hojas amarillean, caen y el tallo adquiere una coloración parda. El peso seco máximo de la semilla, se alcanza cuando al menos, la mitad de las hojas han caído y las que quedan están cloróticas ([Venturi y Amaducci, 1988](#)).

2.2.4. Exigencias ambientales

Se trata de un cultivo de zonas cálidas, la temperatura óptima para su desarrollo se encuentra comprendida entre 20-30°C, reduciéndose su crecimiento por debajo de 10°C y paralizándose por debajo de 4°C ([Nadal y col., 2004](#)). Sin embargo, es capaz de resistir heladas de -2 a -4°C sin morir. Temperaturas superiores a los 40°C provocan daños en la floración y fructificación. La temperatura óptima para

la siembra oscila entre los 15-18°C y los 25°C para la floración. Sin embargo, la floración de la soja puede comenzar con temperaturas próximas a los 13°C. En cuanto al fotoperiodo, la soja es sensible a la duración del día y se considera originariamente como una especie de día corto ([Venturi y Amaducci, 1988](#)).

Las necesidades hídricas están ligadas a las condiciones ambientales, técnicas de cultivo, especie, duración del ciclo de la planta y oscilan entre 300-700 mm. La fase en el que un déficit hídrico puede hacer más daño es en el alargamiento, y en especial, en el llenado de las vainas. La resistencia a la sequía difiere según variedades, siendo mayor en las más tardías ([Venturi y Amaducci, 1988](#)).

La soja no es muy exigente en nutrientes, por lo que a menudo es un cultivo que se emplea como alternativa para aquellos suelos poco fertilizados y que no son aptos para otros cultivos. Se desarrolla adecuadamente en suelos neutros o ligeramente ácidos, con un pH comprendido entre 6,5 y 7 ([Nadal y col., 2004](#)). La sensibilidad de la soja a la caliza activa, desaconseja el cultivo en un suelo que contenga > 15%, si bien, esta sensibilidad difiere entre variedades ([Venturi y Amaducci, 1988](#)). Asimismo, es especialmente sensible al encharcamiento, en cambio, parece resistente a la salinidad.

2.2.5. Técnicas de cultivo

➤ *Fertilización de la soja*

Las necesidades de N son elevadas. Puede ser aconsejable el aporte de 25-30 unidades de N al comienzo del cultivo, antes de que comience a fijar N. Existe un periodo crítico en cuanto a las necesidades de este macronutriente que corresponde a las dos semanas anteriores a la floración, por lo que se deberá controlar la funcionalidad de los nódulos encargados de satisfacer sus requerimientos de N. Plantas cloróticas pueden indicar una mala nodulación; también el que los nódulos no muestren un color rojizo característico ([Nadal y col., 2004](#)).

La soja necesita P durante todo su ciclo de cultivo ya que éste es un elemento poco móvil en el suelo y a que su absorción está ligada a la expansión del sistema radical. De este nutriente se recomienda un aporte de 100 UF ha^{-1} (P_2O_5), siempre que exista déficit en el suelo (Nadal y col., 2004). Respecto al K, las necesidades de la planta son relativamente elevadas.

➤ *Siembra y germinación*

La siembra óptima se realiza cuando el suelo adquiere una temperatura entre 15-18°C. Temperaturas más elevadas ocasionan un descenso en los rendimientos, llegando incluso a no producir, si se utilizan cultivares de maduración precoz (Egli y Bruening, 2000). La siembra se realiza en líneas separadas 30-50 cm, con una densidad de 45-50 plantas m^{-2} y una profundidad de 2-4 cm (Nadal y col., 2004). La germinación es epigea, produciéndose, en tres o cuatro días, con temperaturas comprendidas entre 15-30°C (Nadal y col., 2004).

➤ *Recolección y conservación*

La recolección se realiza cuando el contenido en humedad de las vainas es del 12%, pudiéndose realizar mecánicamente con la cosechadora de cereal, aunque debido a la dehiscencia de las vainas y a la baja altura, que suele presentar la primera vaina en el tallo, se producen considerables pérdidas en granos. Los granos se tienen que almacenar con un contenido máximo de humedad que no sobrepase el 13%, en graneros o silos especialmente indicados para dicho fin (Nadal y col., 2004).

2.2.6. Plagas y enfermedades

Con respecto a las plagas, la rosquilla negra (*Spodoptera littoralis* Boisd.) es una oruga polífaga que causa importantes daños a las hojas, provocando defoliaciones y caídas de las vainas, causando daños muy graves al final del verano. Debe tratarse cuando la oruga es pequeña, ya que es más vulnerable. Se

recomiendan tratamientos con leptodofos, metomilo, acefato, aminocarb, monocrotofos, bromofos, etc. La araña roja (*Tetranychus telarius* L.) es una terrible plaga polífaga, especialmente agresiva en tiempo caluroso y seco. Vive en el envés de las hojas donde tejen los característicos hilos de arañas. Los tratamientos repetidos con tetradifón + dicofol, son eficaces. La gardama (*Laphygma exigua* Hb.) es una plaga polífaga que causa importantes daños en las hojas. Se combate con productos a base de dipterex. Por último, heliotis (*Heliothis armigera* Hb) es un lepidóptero noctuido que ataca tanto a las hojas, botones florales, como a las vainas. Se combate con productos a base de sevín o thiodán.

Entre las enfermedades criptogámicas se encuentra las siguientes: i) antracnosis (*Colletotrichum truncatum*). Se producen manchas redondeadas o irregulares, hundidas, de color marrón en el tallo y hojas, presentando las vainas y semillas la misma sintomatología; ii) fusariosis (*Fusarium sp*) se instala en el sistema vascular de la planta. Produce un amarillamiento de las hojas y una decoloración rojiza en el cuello de la raíz e incluso lesiones que se vuelven de color marrón oscuro. iii) fitóftora (*Phytophthora megasperma*) puede producir pérdidas de hasta el 100% en el cultivo, atacando a todos los estados vegetativos, aunque los primeros son los más sensibles. Es conveniente la utilización de variedades susceptibles, así como la rotación de cultivos no hospedantes y tratar la semilla de siembra con fungicidas específicos ([Nadal y col., 2004](#)).

La bacteria *Pseudomonas glyvinea* provoca en las hojas unas manchas angulares con zonas centrales pardo-amarillentas con un margen húmedo y un halo amarillo verdoso en las hojas. *Xanthomonas phaseoli* se manifiesta con manchas amarillo-verdosas con la parte central rojiza, más evidente en el haz de las hojas. En condiciones de ataques consistentes las hojas aparecen rojizas con pequeños puntos pardos. Los medios de lucha contra estas dos enfermedades son el empleo de semillas sanas, rotaciones adecuadas, enterrado de los residuos después de que hayan sido secados al sol y sobre todo elección de variedades resistentes ([Venturi y Amaducci, 1988](#)).

Entre las enfermedades víricas cabe destacar el mosaico de la alfalfa, el enanismo de la soja y el mosaico de la soja. La transmisión de estos virus se realiza por insectos o semilla. Para su control se recomienda el empleo de variedades resistentes.

2.2.7. Características nutricionales

El contenido proteico del grano puede variar entre el 20-50%, siendo el contenido medio para el grano seco de un 35% y para el verde de un 13%. Las proteínas se caracterizan por tener una proporción adecuada de aminoácidos esenciales, a pesar de que escaseen metionina y cistina. Por otro lado, su elevado contenido en lisina hace que sea interesante para incrementar el valor nutritivo de las mezclas alimenticias ([Venturi y Amaducci, 1988](#)).

Los lípidos de la soja contienen triglicéridos y fosfolípidos, además de tocoferoles, esteroides y derivados de los triglicéridos. El aceite está constituido en su mayoría por ácidos grasos insaturados (oleico 23%, linoleico 53% y linolénico 8%) y en menor proporción por saturados (ácido palmítico 11% y ácido esteárico 4%). El contenido de hidratos de carbono varía en función de las variedades y las condiciones ambientales. El contenido medio en el grano seco es de un 32%, mientras que en el grano verde es < 11,4% ([Venturi y Amaducci, 1988](#)).

Casi todas las vitaminas principales, excepto las vitaminas C y D están presentes en cantidades variables. Las vitaminas hidrosolubles: la tiamina, piridoxina y ácido fólico están presentes en proporciones mayores comparadas con las otras. Cantidades elevadas de Fe, Ca y P se localizan en el grano de soja. Puede contener niveles promedios en el grano seco de 226 mg 100 g⁻¹ en Ca y 546 mg 100 g⁻¹ de P. En el grano verde el contenido de Ca y P es 78 y 158 mg 100 g⁻¹, respectivamente.

Asimismo, la soja contiene en sus semillas un buen número de antinutrientes, entre los que se encuentran inhibidores de la tripsina, hemaglutininas y un factor goitrogénico. Todas estas sustancias desaparecen con el tratamiento industrial de la

preparación de la torta, lo que le convierte en un pienso de excelente calidad como pienso (Nadal y col., 2004).

3.- Fijación de nitrógeno por la simbiosis *Rizobium*-leguminosa

3.1. Generalidades

El aumento espectacular en las cosechas en el siglo XXI ha sido la resultante de una serie de hechos tales como la obtención de cultivares altamente productivos, mejora de las técnicas de cultivo, la utilización de plaguicidas y, por último, pero no menos importante la aplicación de fertilizantes, de manera que a nivel mundial, se atribuye al abonado casi un 50% del aumento de la producción agrícola total.

El N es el factor limitante o uno de los más limitantes para el crecimiento de los cultivos, como lo prueba la estrecha relación existente entre el aumento de la producción mundial de alimentos y el aporte de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, su empleo masivo puede causar riesgos sanitarios para el hombre y daños a los ecosistemas. El consumo de agua y hortalizas con alto contenido en NO_3^- tiene efectos negativos sobre la salud humana. Además, el exceso de N origina problemas de contaminación y eutrofización de las aguas, contribuyendo al efecto invernadero y la destrucción de la capa de ozono.

El N es uno de los elementos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. En la atmósfera se halla en forma de gas (N_2) y representa alrededor del 78%. La litosfera constituye el mayor depósito de N, pero sólo una pequeña porción se encuentra en el suelo en forma asimilable por las plantas. Este elemento constituye aproximadamente entre el 1 y 4% del peso seco de los tejidos vegetales, donde forma parte de biomoléculas esenciales como aminoácidos, nucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos, porfirinas y alcaloides (Marschner, 1995). Las plantas pueden obtenerlo mediante la absorción del NO_3^- y NH_4^+ presentes en el suelo o bien, por reducción del N_2 atmosférico, a través de asociaciones simbióticas con diversas bacterias.

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN), es un proceso natural y eficiente, responsable de la mayor parte del N fijado en los ecosistemas terrestres, representando una alternativa económica y ecológicamente limpia frente a la fijación química (Zahran, 2001). La FBN consiste en la reducción del N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa, y es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la Biosfera. Curiosamente, este proceso crucial sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariotas.

Una de las asociaciones simbióticas de mayor interés agronómico es la establecida entre diferentes géneros bacterianos denominados rizobios y las plantas de la familia *Leguminosae*, así como también, aunque excepcionalmente, con un género de la familia *Ulmaceae* (*Parasponia*), formando unas estructuras llamadas nódulos. Las especies de la familia *Leguminosae* se distribuyen en tres subfamilias: i) *Caesalpinioideae* en la que se incluyen numerosas especies tropicales, con un 25% de especies noduladas, ii) *Mimosoideae* a la que pertenecen especies arbóreas, con un 90% de especies noduladas, y iii) *Papilionoideae*, la mayor subfamilia, con especies de gran importancia agronómica, con un 97% de especies noduladas (de Felipe, 2004; Aparicio-Tejo y col., 2008).

Se estima que aproximadamente 100 leguminosas agrícolamente importantes, contribuyen anualmente con casi la mitad del N fijado biológicamente (de Felipe, 2004), y una de las simbiosis más efectiva es la que se establece entre *Bradyrhizobium japonicum* y la soja, en donde el 70% del N fijado es asimilado por la planta (Baca y col., 2000).

3.2. Nodulación

3.2.1. Rizobios

Las rizobiáceas son un grupo muy heterogéneo de bacterias que se han dividido en cuatro familias: Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae y Bradyrhizobiaceae (Madigan y col. 2000). Dentro de estas familias, sólo unos determinados géneros son capaces de efectuar el proceso de fijación de N_2 : *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*; todas ellas reciben la denominación común de *Rhizobium* (Tabla 1.15).

Tabla 1.15. Clasificación de las bacterias capaces de formar nódulos en leguminosas

Género			
	Especie	Biovariedad	Huésped
<i>Rhizobium</i>		<i>phaseoli</i>	Judía
	<i>leguminosarum</i>	<i>trifolii</i>	Trébol
		<i>viciae</i>	Guisante, haba, lenteja
	<i>galegae</i>		<i>Galega</i>
	<i>tropici</i>		Judía, <i>Leucaena</i>
	<i>etli</i>		Judía, <i>Leucaena</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>saheli</i>		Acacia, <i>Sesbania</i>
	<i>teranga</i>		Acacia, <i>Sesbania</i>
	<i>meliloti</i>		Alfalfa
	<i>huakuii</i>		<i>Astragalus</i>
	<i>fredii</i>		Soja
	<i>loti</i>		<i>Lotus</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>ciceri</i>		Garbanzo
	<i>mediterraneum</i>		Garbanzo
	<i>huakuii</i>		<i>Astragalus</i>
	<i>japonicum</i>		Soja
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>sp. (Lupinus)</i>		Lupino
	<i>sp (cowpea)</i>		Acacia, cacahuete, caupí
	<i>sp. (BTail)</i>		<i>Aeschynomene</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>		<i>Sesbania</i>
<i>Allorhizobium</i>	<i>undicola</i>		Acacia, <i>Faidherbia</i> , <i>Lotus</i> , <i>Neptunia natans</i> .
Adaptado de Aparicio-Tejo y col. (2008)			

Estas bacterias pertenecen al subgrupo α de las Proteobacterias. Tienen morfología normalmente bacilar y no son formadoras de esporas. Son aerobias, Gram-negativas y pueden utilizar una gran variedad de azúcares como fuente de C. Además, son móviles, debido a la presencia de un flagelo polar o subpolar, o de 2 a 6 flagelos periféricos.

A diferencia de las cianobacterias y las bacterias pertenecientes al género *Frankia*, las rizobiáceas no pueden generar un ambiente anaerobio o microaerobio en donde poder realizar la fijación de N_2 por si mismas. Para llevar a cabo el proceso, estas bacterias han de encontrarse en las inmediaciones de especies de la familia de las Fabáceas e interactuar con las mismas, originando una serie de reacciones en la planta que desencadenarán la formación de un órgano mixto nuevo, el nódulo simbiótico, en el cual se genera un entorno controlado, así como los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación.

El género *Rhizobium* forma nódulos con leguminosas de origen templado y crece rápidamente en el medio de cultivo, produciendo acidificación del mismo. La especificidad del huésped es bastante estricta y los genes relacionados con la fijación se encuentran localizados en los plásmidos, generalmente de gran tamaño y tienden a estar más asociados que en *Bradyrhizobium*, formando “clusters” ([Aparicio-Tejo y col., 2008](#)). El 88% de las leguminosas forman nódulos con este género bacteriano ([de Felipe, 2004](#)).

Bradyrhizobium forma nódulos en simbiosis con plantas de origen tropical y subtropical. Son bacterias de crecimiento generalmente lento, que producen alcalinización del medio y poseen una mayor resistencia intrínseca a los antibióticos. Su especificidad por la planta huésped es menos estricta. Los genes relacionados con la simbiosis están situados en el cromosoma ([Aparicio-Tejo y col., 2008](#)). Dentro de este género se reconocen tres especies: *Bradyrhizobium liaoningense* ([Xu y col., 1995](#)), *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium elkanii* ([Kuykendall y col., 1992](#)).

Mesorhizobium presenta una velocidad de crecimiento intermedia entre *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*, así como un grado de similitud con otros rizobios del 93%. *Sinorhizobium* fue caracterizado originalmente como un género integrado por bacterias formadoras de nódulos en la planta de soja, pero con características fenotípicas de las bacterias de crecimiento rápido. El género *Azorhizobium*, sin embargo, es capaz de formar nódulos en los tallos de la especie *Sesbastia rostrata* y fijar N₂ asimbióticamente en presencia de concentraciones de O₂ de hasta un 3%.

Entre las bacterias que forman nódulos con las especies de *Lupinus* se encuentran *Bradyrhizobium canariense*, *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), *Ochrobactrum lupini* y *Phyllobacterium trifolii*. Mientras que las bacterias que forman nódulos con *Glycine* se encuentran *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkani*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Shinorhizobium fredii*, *Shinorhizobium xinjiangense*, *Mesorhizobium albisiae* y *Mesorhizobium tianshanense*.

Antes de llegar a la consecución del nódulo, tanto la planta como la bacteria han de seguir un protocolo, de tal manera que, si cualquiera de ellos incumple alguna de las condiciones establecidas, la formación del nódulo abortará. Dicho protocolo se puede resumir en:

- 1.- Intercambio de señales de naturaleza química entre la planta y la bacteria.
- 2.- Activación del ciclo celular en células del córtex radical e iniciación del nuevo órgano en la planta.
- 3.- Infección por parte de la bacteria, formación del canal de infección e invasión de los tejidos recién formados.
- 4.- Diferenciación de la bacteria a forma especializada

3.2.2. Multiplicación y colonización

Los rizobios se multiplican en la rizosfera, donde su crecimiento está generalmente favorecido por la liberación, por parte de la raíz, de ciertos compuestos orgánicos de distinta naturaleza, denominados rizodeposiciones (Gutiérrez y col.,

2006). En la planta, entre el 10-30% de los fotosintatos son secretados en los exudados radiculares (Bowen y Rovira, 1999), abarcando carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y derivados fenólicos entre los que se encuentran los flavonoides. Por tanto, el establecimiento de la simbiosis es un proceso complejo que está regulado por el simbionte vegetal (Kiers y col., 2003).

Las bacterias del género (*Brady*)-*rhizobium* son atraídas hacia la superficie radical mediante quimiotaxis debido a los flavonoides (concentración nM) liberados por la planta (Fig 1.17A), aunque también se ha descrito que la presencia de corrientes eléctricas endógenas en las raíces, podrían estar implicadas en la atracción de los microorganismos (Millar y col., 1986). Puede haber cierta especificidad entre el tipo de flavonoide liberado por la planta y la respuesta de una determinada especie de rizobio (Phillips y col., 1990). Estos mismos flavonoides en valores del orden de μM , junto con algunos ácidos aldólicos y betaínas, activan los genes responsables de la nodulación (genes *nod*) de la bacteria. Los productos de los genes *nod*, inducen rápidamente la deformación de los pelos radicales de la planta hospedadora, alterando así el crecimiento de los mismos e iniciando la división celular (Long, 1996; Matthysse y Kijne, 1998). La expresión de los genes de la nodulación está influida por diversos factores del suelo como pH, presencia de Ca y concentración de Al (Richardson y col., 1988).

3.2.3. Adhesión a la raíz y proceso de infección

La unión de las bacterias a la superficie de la raíz es un paso preliminar muy importante que precede a la invasión. En este proceso aparecen implicados por un lado, las lectinas, que son unas glicoproteínas producidas por la planta pero sin actividad enzimática, y por otro, los polisacáridos de la pared celular de la bacteria (Kijne y col., 1990). Una vez que las bacterias se han unido a los pelos radicales, se induce un cambio en la dirección del crecimiento apical (Fig. 1.17B).

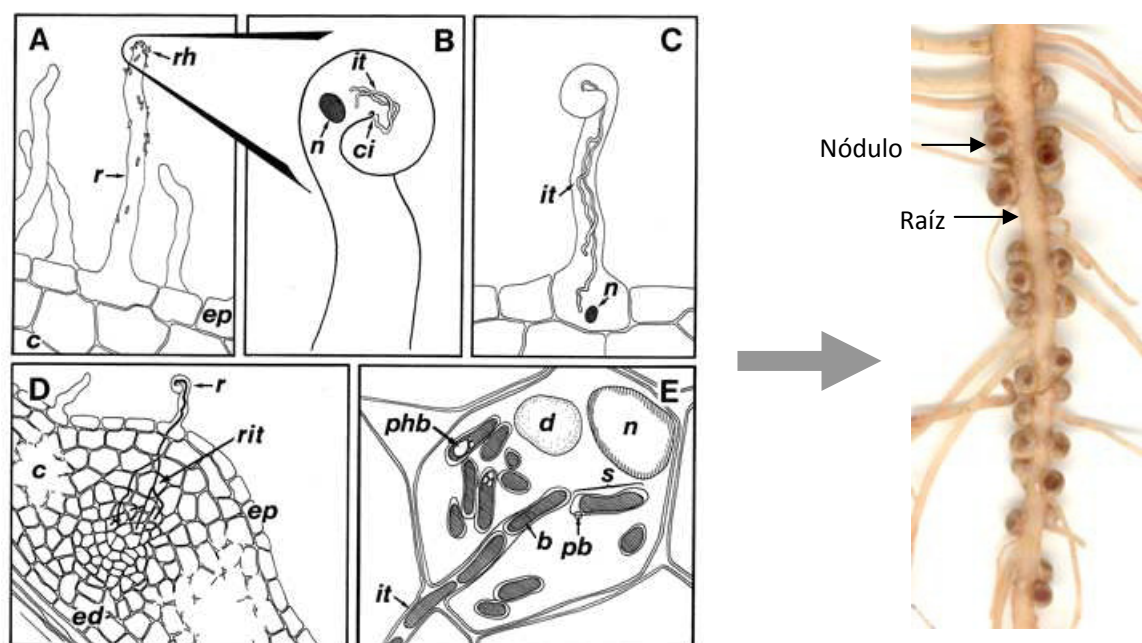


Fig. 1.17. Esquema general del proceso de nodulación. Bacteroides (*b*); centro de infección (*ci*); corteza (*c*); vacuola digestiva (*d*); endodermis (*ed*); epidermis (*ep*); hilo de infección (*it*); núcleo del pelo radical (*n*); membrana peribacteroidal (*pb*); gránulos de poly-β-hidroxibutarato (*phb*); pelo radical (*r*); rizobio (*rh*); ramificación del pelo radical (*rit*); simbiosomas (*s*). Esquema y fotografía tomados de Perret y col. (2000) y de María (2004), respectivamente.

El proceso de infección puede ser de varios tipos. Se puede producir a través de heridas, de manera que los microorganismos consiguen introducirse en el tejido radical a través del punto de emergencia de la raíz lateral. Esta modalidad es relativamente común en la familia *Aeschynomeneae*. Otro mecanismo es el que tiene lugar a través del tejido epidérmico intacto, muy común en las especies arbóreas. Sin embargo, la más estudiada es la asociada a los pelos radicales (Aparicio-Tejo y col., 2008). En las leguminosas típicas, los rizobios penetran a través de la pared celular del pelo radical mediante la secreción de celulasas, quedando envueltas en una estructura tubular, conocida como cordón de infección, que progresa hacia la base del pelo radical (Fig. 1.17C). Este cordón de infección contiene una matriz de origen bacteriano y una glicoproteína de origen vegetal (Brewin, 2004). Presenta una pared celular de composición similar a la de la célula vegetal y está rodeada interiormente de una membrana plásmática (Gage y Margolin, 2000).

3.2.4. Inicio, desarrollo de los nódulos y regulación de la nodulación

Con el inicio del cordón de infección, se produce la activación de la división de un conjunto de células del córtex radical que formarán el primordio nodular. Los cordones de infección con las bacterias en su interior, progresan ramificándose y atravesando las distintas capas de células de la raíz, dirigiéndose hacia el primordio nodular ([Fig. 1.17D](#)). Cuando el canal de infección alcanza las células del primordio nodular, las bacterias son liberadas al citoplasma de las células vegetales, en un proceso similar a la endocitosis, quedando las bacterias confinadas en una vesícula denominada simbiosoma o unidad fijadora de N ([Fig. 1.17E](#)). Finalmente, con la aparición del simbiosoma, el primordio nodular se convierte en nódulo maduro ([Maunoury y col., 2008](#)).

El simbiosoma está constituido por uno o más bacteroides, dependiendo de la simbiosis, los cuales están rodeados de la membrana peribacteroidal, que les separa del citosol de las células infectadas ([de Felipe, 2009](#)). Al espacio interior del simbiosoma se le denomina espacio peribacteroideo, en donde se encuentran los bacteroides, los cuales expresan actividad nitrogenasa y determinados citocromos que no estaban presentes en las bacterias en vida libre. Durante el proceso de formación de los simbiosomas, las bacterias sufren importantes alteraciones morfológicas y metabólicas, transformándose finalmente en bacteroides. Estos a su vez, están rodeados por la membrana bacteroidal.

La formación de los nódulos individuales en la planta no es un proceso independiente. El origen de los primeros nódulos inhibe la formación de los nódulos subsiguientes en un proceso típico de regulación feedback. Las respuestas autorregulatorias son sistémicas y están controladas por la parte aérea de la planta. La escisión de los primeros nódulos posibilita la formación de otros nuevos. En general, la posibilidad de iniciación nodular se halla restringida a la región donde se forman pelos radicales. Si bien, este proceso de autorregulación difiere entre especies vegetales ([Aparicio-Tejo y col., 2008](#)).

3.3. Tipos de nódulos

Dependiendo del sistema simbiótico se pueden encontrar dos tipos de nódulos: determinados e indeterminados, los cuales son (ultra)estructural- y metabólicamente bastante diferentes (Tabla 1.16 y Fig. 1.18), difiriendo en la forma en que se comporta la bacteria dentro del nódulo (Franssen y col., 1992; Hirsch, 1992). Las diferencias radican en la presencia o no de meristemo apical, en la forma, en la organización histológica y anatómica, en la vía de asimilación del amonio y en el tipo de metabolitos nitrogenados que exportan (Sprent y James, 2007).

Tabla 1.16. Características de los nódulos con crecimiento determinado e indeterminado

Parámetro	Nódulo	
	Determinado	Indeterminado
Planta huésped	Soja, judía, caupí	Alfalfa, guisante, trébol
Origen geográfico	Tropical y subtropical	Templado
Forma del nódulo	Esférica	Cilíndrica, a menudo ramificado
Divisiones celulares iniciales	Córtex externo	Córtex interno
Tipo de sistema vascular	Cerrado	Abierto
Células infectadas	Virtualmente no vacuoladas	Generalmente vacuoladas
Destino de las primeras moléculas de N ₂ fijadas	Crecimiento nodular	Exportación a la planta (xilema)
Inductores de genes <i>nod</i>	Isoflavonas	Flavonas y flavononas
Producto exportado	Ureidos	Amidas
Tomado de Aparicio-Tejo y col. (2008)		

Los nódulos indeterminados se dan en leguminosas de climas templados (*Lupinus*, *Medicago*, *Pisum* y *Trifolium*). En este tipo de nódulos las divisiones mitóticas tienen lugar en el córtex interno y el cordón de infección llega hasta las células próximas al cilindro vascular, perdurando el proceso de infección a lo largo de la existencia del nódulo (Aparicio-Tejo y col., 2008). Presentan diferentes regiones en la zona central, con células que se encuentran en distintas etapas de desarrollo, debido a que poseen un meristemo persistente en el ápice. Esta característica le otorga una forma cilíndrica (Fig. 1.18), a menudo con ramificaciones, puesto que

constantemente se añaden nuevas células a la parte distal del nódulo (Mayz-Figueroa, 2004).

Los nódulos determinados los forman las leguminosas de climas tropicales y subtropicales (*Glycine*, *Phaseolus* y *Vigna*). Se caracterizan porque las divisiones se originan en el córtex externo y por presentar una forma esférica (Fig. 1.18). A diferencia de los indeterminados, esta clase no presenta un meristemo permanente y la zona infectada está formada por células que se encuentran en un estadio similar de desarrollo. En la formación de estos nódulos, la actividad meristemática cesa temprano, 12-18 días después de la inoculación y a partir de ese momento, el aumento del tamaño del nódulo se produce por crecimiento celular (Mayz-Figueroa, 2004). En este caso, no todas las células de la zona central son infectadas por el cordón de infección. Las infectadas, se dividen hasta conformar el nódulo, y pueden ser identificadas por su gran tamaño y densidad, debido a la elevada presencia de simbiosomas en su interior. Estas simbiosomas, a diferencia de los existentes en nódulos indeterminados, pueden presentar más de un bacterioide. Las células no infectadas reciben el nombre de células parenquimáticas o intersticiales. Estas células presentan menor tamaño que las infectadas, contienen gran cantidad de vacuolas y participan en el intercambio de metabolitos con las infectadas.

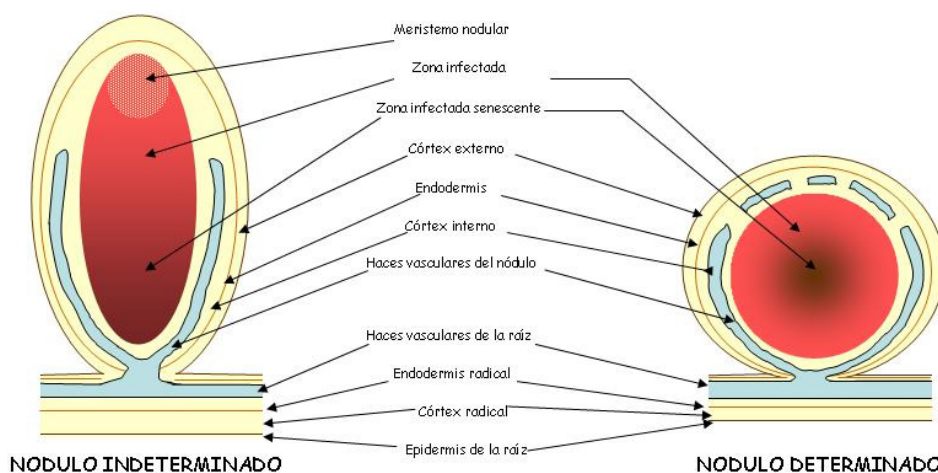


Fig. 1.18. Morfología del nódulo indeterminado (izda.) y determinado (dcha.). Tomado de http://www.unavarra.es/servicio/herbario/leguminosas/htm/patrones_desarrollo_L.htm

En el caso concreto del altramuz y la soja, ambas son principalmente noduladas por rizobios de crecimiento lento del género *Bradyrhizobium*. Si bien, los nódulos de soja son de tipo determinado, mientras que los de altramuz, son un subtipo especial y único dentro de los nódulos indeterminados, que recibe el nombre de nódulo lupinoide; donde la vía de entrada de *Bradyrhizobium* y el proceso de infección de las raíces es característico de esta especie (Fenández-Pascual y col., 2007). La entrada de la bacteria se realiza entre la parte basal del pelo radical y las células epidérmicas contiguas; la invasión y la posterior liberación de los rizobios en las células corticales, ocurre en zonas alteradas de la pared celular (González-Sama, 2003). La infección muestra mayor similitud con el modelo de infección de *Arachis hypogaea*, que con la típica de los nódulos indeterminados, ya que no se produce a través del cordón de infección. Asimismo, no muestra la mayoría de las características de este tipo de nódulos como son, forma cilíndrica, meristemo apical persistente, y un gradiente de diferenciación en la zona infectada que va desde el meristemo hasta la base del nódulo (González-Sama, 2006). En las etapas tempranas de desarrollo, el nódulo de altramuz crece en todas las direcciones adquiriendo una forma esférica, que recuerda a la que tienen los nódulos determinados. En los nódulos jóvenes, el meristemo constituido por células infectadas y no infectadas, se localiza rodeando a la zona infectada. Conforme el nódulo madura, la zona meristemática queda circunscrita a la región basal-lateral, y el nódulo continúa creciendo, pudiendo rodear completamente la raíz, momento en el que cesa su desarrollo (González-Sama y col., 2006).

3.4. Estructura de los nódulos de altramuz y soja

Las características estructurales del nódulo lupinoide de altramuz, han sido ampliamente estudiadas por Fernández-Pascual y col. (2007). Parson y Day en 1990 fueron los primeros en describir detalladamente la estructura de los nódulos de soja. En la estructura nodular madura de altramuz y soja se diferencian claramente dos regiones: la corteza y la zona central infectada. En la corteza de ambos nódulos se sitúa la barrera a la difusión de oxígeno la cual, junto con otros mecanismos que se

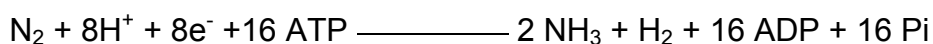
detallan mas adelante, es la encargada de regular la concentración de oxígeno en las proximidades de los bacteroides. La barrera está formada por dos o tres capas de células cuyos espacios intercercelulares están parcialmente rellenos de agua y glicoproteínas. La barrera responde a los cambios en la concentración externa de oxígeno producidos por estreses ambientales. A nivel estructural, en nódulos de soja, la barrera se situó en una capa de células muy empaquetadas con espacios intercelulares muy reducidos, denominada “boundary layer” o capa límite (Parson y Day 1990). La visualización y funcionamiento de la barrera fue llevada a cabo en nódulos de altramuz por Fernández-Pascual y col. (1992) y de Lorenzo y col. (1993). Los nódulos de altramuz resultaron especialmente útiles para el estudio de la barrera, ya que tienen una estructura muy clara y responde a situaciones de estrés mas lentamente que en otras leguminosas.

La zona central del nódulo se denomina zona infectada y en ella se encuentran las células infectadas repletas simbiosomas con sus correspondientes bacteroides. Los simbiosomas del nódulo de *Glycine max* se encuentran repletos de bacteroides, mientras que los de *Lupinus albus* se caracterizan por contener un único bacteroide. Otra diferencia a destacar entre ambas leguminosas, es que en soja, la zona infectada existen células infectadas y no infectadas, mientras que en los de altramuz, todas las células de la zona central están infectadas, lo que constituye otra característica diferencial de esta leguminosa (de Lorenzo, 1992; de Felipe, 2009).

3.5. Fisiología del nódulo

La fijación de N_2 está catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, cuyas propiedades son constantes en todos los microorganismos fijadores estudiados. La nitrogenasa cataliza la reducción altamente endoergónica de N_2 atmosférico a NH_4^+ en presencia de Mg^{2+} , ATP, un donador de electrones (e^-) y una baja concentración de O_2 . La enzima consta de dos ferrosulfoproteínas extremadamente sensibles al O_2 : i) FeMo-proteína (dinitrogenasa, Componente I) que está formada por cuatro subunidades, cada una de las cuales tiene dos centros Mo-Fe-S y un número variable

de centros Fe-S, y ii) Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa, Componente II) que es la más pequeña de los dos componentes; formada por dos subunidades idénticas y tiene cuatro centros Fe-S. La reacción de reducción que llevan a cabo estas proteínas es la siguiente:



La FeMo-proteína, es la responsable de la reducción del sustrato N_2 molecular a NH_3 , utilizando los e^- donados por la Fe-proteína. Durante la reacción de la nitrogenasa, el ATP debe encontrarse como complejo ATP·Mg, ya que, en estado libre es un inhibidor. La Fe-proteína enlaza el ATP·Mg y reduce específicamente la FeMo-proteína, mientras que esta última proteína enlaza y reduce al sustrato (Fig. 1.19). El reductor fisiológico de la Fe-proteína de los bacteroides es la ferredoxina, una proteína de potencial redox muy negativo y muy sensible al O_2 , que recibe los e^- a su vez de la cadena respiratoria. Durante cada ciclo de transferencia de un e^- , la Fe-proteína se asocia y disocia de la FeMo-proteína, y son hidrolizadas dos moléculas de ATP (Aparicio-Tejo y col., 2008).

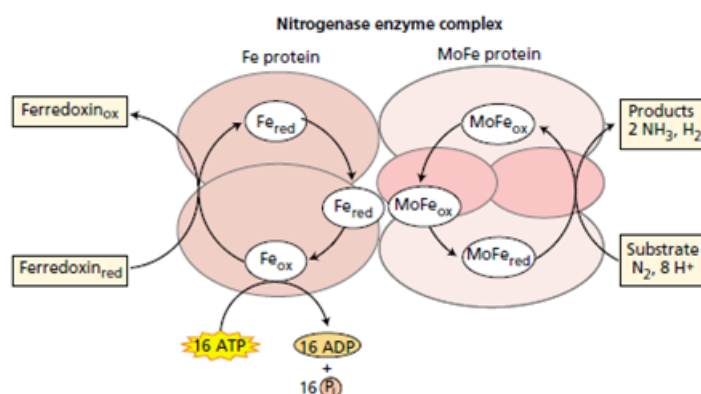


Fig. 1.19. Esquema de la reacción catalizada por la nitrogenasa. Tomado de Taiz y Zeiger (2002)

Esta fijación enzimática del N_2 es un proceso con un elevado coste energético ($\approx 960 \text{ KJ mol}^{-1}$ de N_2 fijado), que requiere el acoplamiento de un sistema eficiente de generación de ATP, como la fosforilación oxidativa. Del 30 al 60% de la energía suministrada para la nitrogenasa se pierde como H_2 , disminuyendo la eficiencia de la fijación de N_2 . Algunos rizobios, sin embargo, contienen una hidrogenasa capaz de reciclar el H_2 formado por la nitrogenasa, mejorando así la eficiencia del proceso (Marschner, 1995). Por otra parte, la respiración bacteroidal suministra ATP para el proceso de fijación, pero la enzima nitrogenasa es extremadamente lábil al O_2 . Por ello, la concentración de O_2 en las proximidades de la enzima debe controlarse, mediante mecanismos adecuados, adoptando diversas estrategias para crear un ambiente microaeróbico, de forma que el O_2 no llegue a inactivar a la enzima (Becana y Rodríguez-Barrueco, 1989). Para ello, los nódulos de las leguminosas han desarrollado mecanismos de resistencia variable, mediante una barrera de resistencia a la difusión de O_2 , una elevada tasa de respiración bacteroidal y un transportador específico de alta afinidad por el O_2 , la leghemoglobina (Lb) (Fernández-Pascual, 2007).

La barrera de resistencia a la difusión del O_2 está constituida por varias capas compactas de células situadas en la corteza media. Una vez el O_2 ha entrado en la corteza, es la Lb la que facilita el transporte del O_2 a los bacteroides y controla la concentración de O_2 libre. La Lb es una hemoproteína monomérica que se localiza en el citoplasma de las células infectadas, constituyendo el 25% del contenido proteico total, además de conferir un color rosado a los nódulos maduros (Vivo y col., 1989). Funcionalmente, la Lb facilita la difusión de O_2 a través del citosol de las células infectadas, hasta la membrana de los simbiosomas. Estructuralmente, está constituida por un grupo prostético hemo (protoporfirina IX) y un único polipéptido (globina). La respiración de los bacteroides para obtener el ATP necesario para el funcionamiento de la nitrogenasa, es el tercer y último mecanismo de protección al O_2 . Sin embargo, una concentración baja de O_2 es necesaria para que la respiración bacteroidal sea eficiente; esto se consigue mediante la expresión de una isoforma enzimática de la citocromo oxidasa de elevada afinidad por el O_2 .

3.6. Metabolismo nodular

3.6.1. Metabolismo del carbono

La energía necesaria para la fijación de N_2 proviene originariamente de la fotosíntesis, siendo la sacarosa el sustrato carbonado más importante, el cual, es transportado por el floema hasta los nódulos, así como a otros sumideros de la planta. La sacarosa es un disacárido no reductor formado por la unión $\alpha(1-2)-\beta$ de α -D-glucopiranososa y β -D-fructofuranosa. Al llegar al córtex nodular, difunde dentro de las células infectadas para ser metabolizada, con la finalidad de suministrar esqueletos de C para la respiración bacteroidal y la asimilación de NH_4^+ , así como, para otros procesos metabólicos (Fig. 1.20). La sacarosa se hidroliza a glucosa y fructosa por la actividad de la sacarosa sintasa (SS) localizada en el citosol, así como por la invertasa alcalina (IA). Los monosacáridos son hidrolizados a través de la ruta glucolítica, hasta la obtención de fosfoenolpiruvato. La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) cataliza la incorporación del CO_2 respiratorio al fosfoenolpiruvato para producir oxalacetato, el cual es bastante inestable y es rápidamente reducido a malato, en una reacción catalizada por la malato deshidrogenasa (MDH).

Los ácidos dicarboxílicos constituyen la principal fuente de C y energía para los bacteroides, siendo el malato el ácido orgánico más abundante en los nódulos y el sustrato preferente para la respiración bacteroidal. Aparte de malato se obtiene succinato y pequeñas cantidades de etanol, lactato y acetaldehído. El bacteroide va a poder utilizar uno o varios de estos compuestos de C como fuente de energía, dependiendo de la permeabilidad de la membrana peribacteroidal a dichos compuestos. Dicha membrana es altamente permeable al malato y succinato, pero poco permeable al glutamato, piruvato y α -cetoglutarato. Ello se debe a que en dicha membrana existe un sistema transportador de alta afinidad por ambos ácidos dicarboxílicos. Una vez incorporados, los ácidos son oxidados durante la intensa respiración bacteroidal proporcionando a la nitrogenasa, ATP y poder reductor (Aparicio-Tejo y col., 2008).

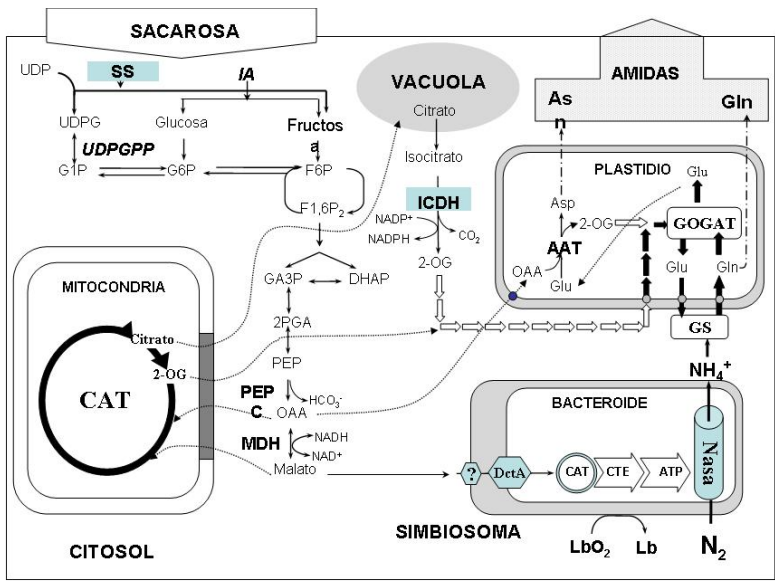


Fig. 1.20. Esquema de las principales rutas metabólicas de C y N que tienen lugar en el citosol, simbiosomas, mitocondrias y plastidios de una célula infectada de nódulos de crecimiento indeterminado. AAT: aspartato aminotransferasa; GOGAT: glutamato sintasa; GS: glutamina sintetasa; IA: invertasa alcalina; ICDH: isocitrato deshidrogenasa; MDH: malato deshidrogenasa; Nasa: nitrogenasa; PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa; SS: sacarosa sintasa; UDPGPP: UDP-glucosa pirofosforilasa. Tomado de González y col. (2006)

3.6.2. Asimilación de N en la fracción vegetal de los nódulos

El primer producto estable obtenido por el proceso de FBN es el NH_4^+ , el cual es liberado por los bacteroides al citoplasma, donde es incorporado a sustratos carbonados. El NH_4^+ es un inhibidor de la síntesis de la nitrogenasa, por lo que es necesario su rápida asimilación. Esto sucede mediante la intervención de la glutamina sintetasa (GS), que cataliza principalmente la incorporación del NH_4^+ al glutamato con consumo de ATP y la de NADH-glutamato sintasa (GOGAT), que transfiere el grupo amida de la glutamina al α -cetoglutarato. Otra vía de asimilación del NH_4^+ la constituye la NADH-glutamato deshidrogenasa, que cataliza la incorporación de un grupo amino al α -cetoglutarato para producir glutamato. Asimismo, la glutamina puede donar su grupo amida al aspartato formando asparagina, principal amida transportada en algunas leguminosas. El NH_4^+ una vez asimilado, es exportado por el xilema hacia el vástago de la planta en forma de amidas o ureidos (Fig. 1.21). Las leguminosas de origen templado exportan el N en forma de amidas (glutamina, asparagina y 4-metilglutamina) independientemente de si obtienen el N o no, mediante la FBN. Las de origen tropical y subtropical, lo exportan en forma de ureidos

como, alantoína, ácido alantoico y citrulina (Mayz-Figueroa, 2004). Sin embargo, este grupo de leguminosas exporta glutamina y asparagina fundamentalmente, cuando crece con una fuente de N mineral, pero al establecer una asociación simbiótica pasan a sintetizar ureidos, para distribuir el N al resto de la planta (González y col., 2006). Los ureidos presentan una elevada proporción N/C, lo que se traduce, en un gasto menor de C orgánico, para sintetizar la misma cantidad de N que las amidas y, por lo tanto, se consideran formas de transporte muy eficaces.

Los ureidos proceden de las purinas sintetizadas en las células infectadas, y de su posterior oxidación en las células no infectadas de la zona central del nódulo (Fig. 1.21). La síntesis de purinas tiene lugar en los plastidios de las células infectadas a partir de glutamina, glicina, aspartato y ribosa-5-fosfato. El paso limitante de este proceso tiene lugar a nivel de la inosina monofosfato deshidrogenasa que cataliza la oxidación de la inosina monofosfato a xantina monofosfato. La xantina es exportada por el plastidio al citosol, para ser oxidada a ácido úrico por la xantina deshidrogenasa. Posteriormente, el ácido úrico es transportado a los peroxisomas de la célula no infectada, en donde se va a transformar en alantoína por acción de la uricasa. Finalmente, en el retículo endoplasmático, la alantoína se transforma en ácido alantoico por la acción de la alantoinasa (González y col., 2006).

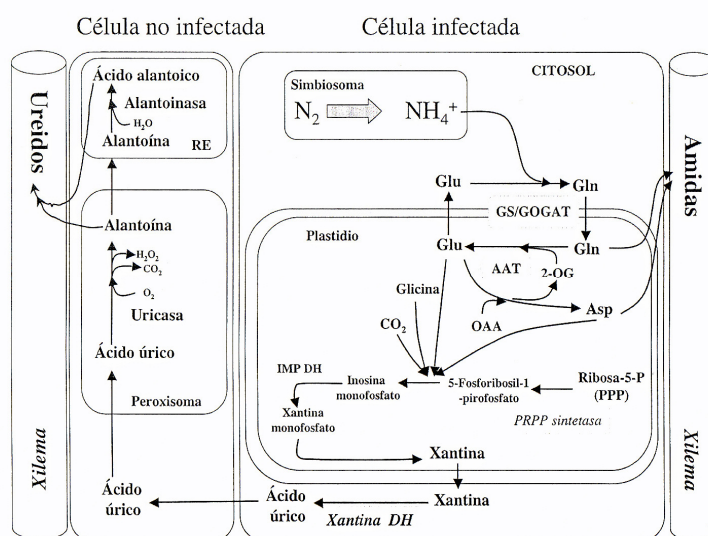


Fig. 1.21. Biosíntesis de compuestos nitrogenados en nódulos de leguminosas. Tomado de González y col. (2006)



Objetivos

A la vista de los antecedentes descritos en la Introducción, el objetivo general y los específicos de la presente memoria son:

Evaluar las estrategias y/o los mecanismos metabólicos, morfológicos y fisiológicos que adoptan las leguminosas en simbiosis o no frente al estrés por Cu.

- i) Estimar los parámetros cinéticos de absorción de Cu en plantas de altramuz y soja y su interacción con otros metales (Zn, Mn, Cd).
- ii) Determinar los índices morfológicos y fisiológicos del crecimiento de plantas de altramuz y soja desarrolladas en condiciones de normalidad y exceso de Cu.
- iii) Estudiar los patrones de localización del Cu y su distribución subcelular en plantas de altramuz y soja, desarrolladas en condiciones normalidad y exceso de Cu. Desequilibrios nutricionales.
- iv) Evaluar bioindicadores metabólicos de estrés y alteraciones enzimáticas del metabolismo del C y N inducidas por el exceso de Cu.
- v) Describir modificaciones estructurales en tejidos de planta y nódulos inducidas por el exceso de Cu.
- vi) Diagnóstico, evaluación y comparación del umbral de toxicidad por Cu en plantas de altramuz y soja en condiciones de fijación y no fijación de N₂. Diferencias inter-específicas.

Los objetivos específicos de la presente memoria se corresponden con el planteamiento y desarrollo, de diversos experimentos biológicos, los cuales constituyen el plan de trabajo de esta investigación y que pueden sintetizarse de la siguiente manera:

1. Experimentos a corto y medio plazo para evaluar las cinéticas de absorción de Cu y su interacción con otros metales.

2. Experimentos dosis-respuesta en condiciones controladas:

2.1. Experimentos dosis-respuesta con dosis bajas de Cu 1,6 - 16 μM , en hidroponía sin sustrato y sin fijación de N_2 .

2.2. Experimentos dosis-respuesta con altas dosis de Cu 1,6 - 144 μM , en hidroponía sin sustrato y sin fijación de N_2 .

2.3. Experimentos dosis-respuesta con 1,6, 48, 96 y 192 μM Cu, en hidroponía con sustrato y fijación de N_2 .

3. Experimentos a largo plazo con dos dosis de Cu (normal y exceso):

3.1. Hidroponía sin sustrato y sin fijación de N_2 : (1,6 y 24 μM Cu)

- Evaluación de diversos índices morfológicos y fisiológicos de desarrollo foliar y radicular.
- Estudio del fraccionamiento y localización subcelular de elementos.
- Estudio de alteraciones morfológicas y estructurales, y microanálisis de elementos.

3.2. Hidroponía con sustrato y fijación de N_2 : (1,6 y 192 μM Cu)

- Alteraciones ultraestructurales en hojas y nódulos.
- Determinación de proteínas y actividades enzimáticas del metabolismo del N y C en planta y nódulos.

4. Comparación entre los experimentos con y sin fijación de N_2 . Evaluación del umbral de toxicidad y de diferencias inter-específicas.



Materiales y Métodos

1. Especies Vegetales

En todos los experimentos se han empleado semillas de *Lupinus albus* L. cv. Marta, procedentes del Centro de Investigación Agraria-Finca La Orden - Valdesequera (SIDT, Junta de Extremadura) y de *Glycine max* L. Merrill cv. Williams procedentes de Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA, Junta de Andalucía), Centro las “Torres-Tomejil”, Sevilla.

El cv. Marta procede del área Mediterránea. Ha sustituido a Multolupa, genotipo de otoño y originario del norte de Europa, pero muy utilizado en España durante bastantes años. Marta es una variedad dulce, de tipo primavera o ciclo corto, con una pauta de crecimiento indeterminado. Prefiere suelos profundos de textura arenosa, adaptándose muy bien a zonas de clima templado, suelos pobres y de pH ácido-neutro. Presenta un menor número de hojas, semillas más pequeñas y con un periodo de maduración más corto que los genotipos de otoño. Además, si bien la raíz del cv. Marta tiene la misma capacidad de extracción y acumulación de contaminantes que la de Multolupa, el cv. Marta presenta una menor transferencia de Cd y Hg a los órganos fotosintéticos, lo que podría traducirse en una mayor tolerancia al estrés por metales.

El cv. Williams se obtiene en Illinois (EE.UU.) en 1970, y surge del cruce de la variedad Wayne x la línea L57-0034 (Clark x Adams). En los años 70-80 llegó a ser muy cultivada sobre todo en los estados del medio Oeste. También en España llegó a ser muy popular en los años 80. Es un cv. con una pauta de crecimiento indeterminado, es decir, que sigue aumentando de porte después de la floración. Pertenece al grupo de maduración III, según la clasificación americana. En latitudes medias, como la de España, el ciclo vegetativo (desde emergencia a maduración) es de unos 130-135 días. Es una variedad muy productiva y con muy buen comportamiento en las condiciones españolas, sobre todo en Andalucía y Extremadura. Prefiere suelos de textura media o ligera, de pH ligeramente ácido y que no contengan mucha caliza (Sobrino- Vasperinas, 1991).

2. Microorganismos

En los experimentos llevados a cabo en condiciones de fijación de N₂ se han empleado las bacterias siguientes:

- *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) cepa ISLU16, procedente de la colección de la Dra. Mercedes Fernández-Pascual del Instituto de Ciencias Agrarias del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid.
- *Bradyrhizobium japonicum* (*Glycine max*) cepa USDA110 procedente de la colección del Dr. Francisco Temprano del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA, Junta de Andalucía), Centro las “Torres-Tomejil”, Sevilla.

Para preparar los inóculos, las bacterias crecieron en un medio Vincent (Vincent, 1970), cuya composición se muestra en la **Tabla 1**. La suspensión bacteriana se obtuvo mediante incubación en estufa (INDELAB 600 W) a 28°C y oscuridad durante 4 días para *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) y 7 días para *Bradyrhizobium japonicum* hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento.

Tabla 1. Composición del medio Vincent

Composición	
	g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Manitol	10
Extracto de levadura	0,4
pH	6,8

3. Cámara de cultivo

El crecimiento de las especies vegetales se realizó en una cámara de cultivo (Dycometal, CCKO/16985), perteneciente al Departamento de Química Agrícola de la Universidad Autónoma de Madrid (**Fig. 1**). La cámara tiene una superficie aproximada

de 8 m² y está dotada de circulación del aire, controles de temperatura, humedad, fotoperiodo e intensidad luminosa suministrada por tubos fluorescentes (Silvania, 58 W) y bombillas incandescentes de vapor de Na (Osram Vialox, 150 W). En la [Tabla 2](#) se muestran las condiciones ambientales programadas durante los experimentos.



Fig. 1. Vista exterior e interior de la cámara de cultivo utilizada

Tabla 2. Condiciones ambientales programadas en los experimentos

Condiciones ambientales		
	Día	Noche
Temperatura (°C)	25	20
Humedad relativa (%)	40	60
Fotoperiodo (h)	13	11
Intensidad luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	520	---

4. Semilleros y transplante

Las semillas de *Lupinus albus* L. cv. Marta se lavaron con 400 mL de agua destilada y 10 mL de una disolución al 10% de hipoclorito sódico bajo agitación suave durante 30 min. A continuación se lavaron con agua destilada (3 veces, 20 min) para eliminar restos de suciedad y plaguicidas. Posteriormente, se colocaron en unos recipientes de plástico (15,5 x 25,5 x 6,5 cm) con cierre hermético. En el fondo de los mismos se colocó una capa doble de papel de filtro humedecido con agua destilada (50 mL). Sobre la cual se colocaron las semillas y se cubrieron con otra capa doble de

papel, sobre la que se vertieron 30 mL de agua destilada y 20 mL de una disolución 1 mM de CaSO_4 . La germinación de las semillas se llevó a cabo en oscuridad, en una estufa (IDL, INDELAB 600 W) a 28°C y durante 3 días.

La germinación de las semillas de *Glycine max* L. cv. Williams se realizó en bandejas de plástico (30 x 40 x 11,5 cm) rellenas con 4 L de perlita previamente desinfectada y humedecida con agua destilada. Las semillas se colocaron sobre el sustrato y se cubrieron con una capa de 1 cm de perlita. Las bandejas se taparon con un plástico transparente y se introdujeron en la cámara de cultivo, durante 7 días y bajo condiciones ambientales controladas (Tabla 2).

En los experimentos realizados bajo condiciones de fijación de N_2 , las semillas de altramuiz y soja se lavaron abundantemente con agua destilada estéril y se dejaron en imbibición durante una hora. Las semillas se inocularon en el momento de la siembra (0,5 mL inóculo semilla⁻¹) de las suspensiones bacterianas en fase exponencial de crecimiento (10^8 células mL⁻¹) de las cepas correspondientes. A continuación, las plantas de altramuiz se metieron en estufa y las de soja en cámara de cultivo a 28°C. Una vez producida la nascencia, se procedió a realizar el transplante de las plántulas al recipiente de cultivo definitivo, el cual contenía una disolución nutritiva sin N (20% diluida) durante 7 días. Pasado este tiempo, las plantas se inocularon de nuevo con 2 mL inóculo planta⁻¹ y se introdujeron en la cámara de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas. El aspecto de los semilleros se puede observar en la Fig. 2.

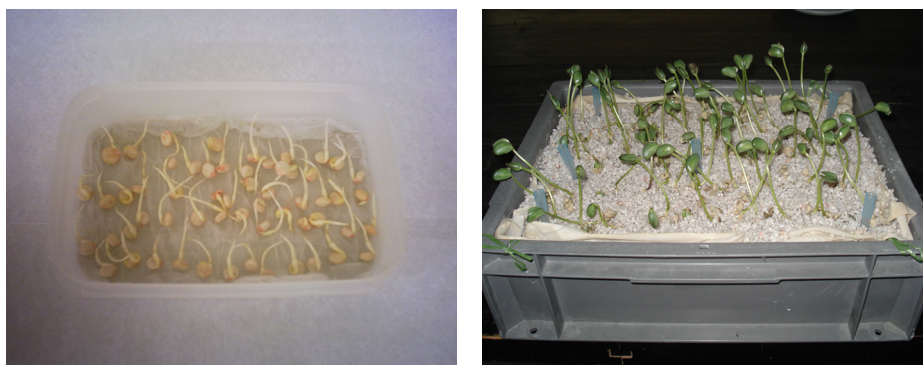
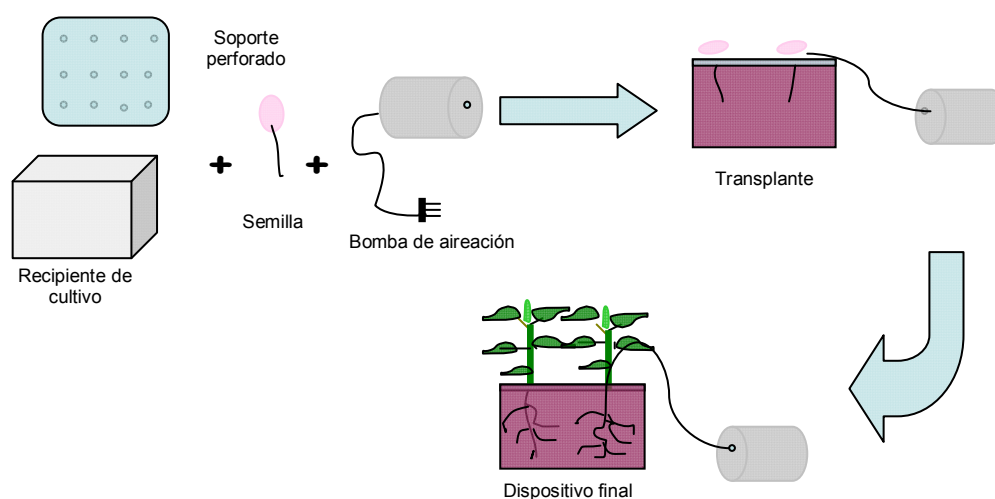


Fig. 2. Aspecto de los semilleros de altramuiz y soja

5. Sistemas de cultivo

5.1. Hidroponía pura o sin sustrato

Este sistema de cultivo puede ser definido como aquel en el que mediante un sistema adecuado de sujeción, la planta desarrolla sus raíces en un medio acuoso con nutrientes disueltos y aireación, sin ningún tipo de sustrato sólido. Un esquema del dispositivo utilizado en los experimentos realizados sin fijación de N_2 se muestra en la figura siguiente:



Como recipientes de cultivo se utilizaron tiestos de plástico (16 x 16 x 11 cm) opacos a la luz y con capacidad para 3 L de disolución nutritiva, sobre los que se colocaron unas planchas de PVP perforadas para sujetar a las plantas. Para asegurar la aireación de las raíces se utilizó un sistema de oxigenación a través de canales perforados, con tubos de plástico conectados a unas bombas de 3 W. Las dimensiones del recipiente de cultivo y la disposición de las plántulas en la cámara de crecimiento se muestran en la [Fig. 3](#).

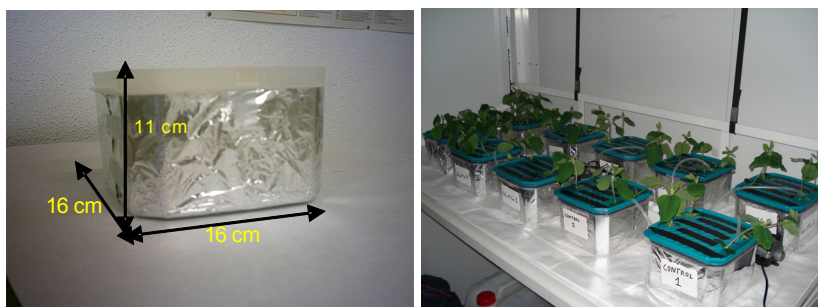


Fig. 3. Recipiente de cultivo y disposición de las plántulas en la cámara de crecimiento

La composición de macro- y micronutrientes de la disolución nutritiva (DN) control empleada en los experimentos de hidroponía sin sustrato se muestra en las **Tablas 4 y 5**, respectivamente.

Tabla 4. Macronutrientes

mmol/L				
	NO_3^-	H_2PO_4^-	$\text{SO}_4^{=}$	Suma cationes
K^+	4	1,5	-	5,5
Ca^{2+}	3	-	-	3,0
Mg^{2+}	-	-	2	2,0
Suma aniones	7	1,5	2	10,5

Tabla 5. Micronutrientes

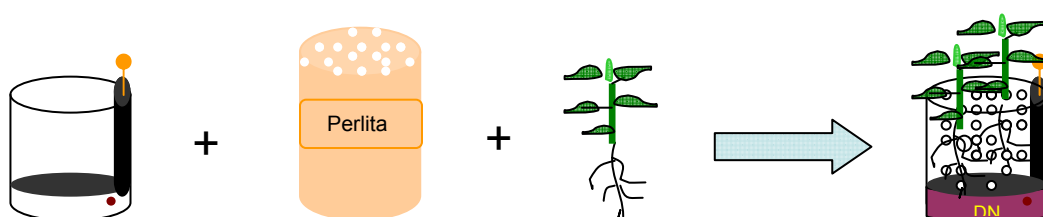
Sal utilizada		
	$\mu\text{g elemento mL}^{-1}$	μM
H_3BO_3	0,500	46,2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,800	32,8
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,100	1,6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,100	1,6
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,095	1,0
Fe-EDDHA 6,0 %	2,000	35,9

La DN se preparó a partir de unas madres, de cada una de las sales, de concentración 100 veces superior a la disolución final para los macronutrientes y Fe y, 1000 veces superior para el resto de los micronutrientes (pH 5,5 - 6). Las DN se

renovaron completamente cada siete días para evitar la concentración del medio de nutrición y cada tres días se reponía el volumen inicial (3 L) con agua destilada.

5.2. Hidroponía con sustrato

Este sistema de cultivo podría ser definido como el cultivo de plantas sin el uso de suelo, pero con el empleo de un sustrato, como arena gruesa, turba, vermiculita o perlita al que se agrega una disolución nutriente que contiene los elementos esenciales requeridos por la planta. Este sistema de cultivo se utilizó en los experimentos llevados a cabo con fijación de N_2 . Un esquema del dispositivo experimental utilizado se muestra en la figura siguiente:



Como recipientes de cultivo se utilizaron tiestos de plástico tipo “Riviera” opacos a la luz y con capacidad para 2 L de sustrato (perlita) y 0,75 L de DN (Fig. 4).



Fig. 4. Recipientes de cultivo y disposición de las plántulas en la cámara de crecimiento

La composición de macronutrientes de la disolución nutritiva sin NO_3^- (Lang y col., 1993) utilizada como control en estos experimentos se muestra en la Tabla 6. Los micronutrientes se suministraron como se indica en la Tabla 5. La preparación y los cambios de las DN, así como el procedimiento seguido para reponer el agua perdida por evapotranspiración son similares al seguido en los experimentos realizados sin fijación de N_2 .

Tabla 6. Macronutrientes

mmol/L				
	$\text{SO}_4^{=}$	H_2PO_4^-	Cl^-	Suma cationes
K^+	2,0	1,5	0,5	4,0
Ca^{2+}	-	-	1,0	1,0
Mg^{2+}	2,0	-	-	2,0
Na^+	-	-	0,1	0,1
Suma aniones	4,0	1,5	1,6	7,1

6. Diseño experimental - Experimentos realizados

6.1. Cinéticas de absorción por raíces aisladas de altramuzy soja

Para el estudio de las cinéticas de absorción de Cu, Cu + Zn, Cu + Mn y Cu + Cd se procedió de la siguiente manera: Semillas de altramuzy soja desinfectadas y germinadas se transfirieron a unos recipientes de plástico y se cultivaron en cámara de crecimiento en hidroponía pura durante siete días utilizando una DN control 20% diluida (Tablas 4 y 5).

La metodología seguida está basada en la descrita por Esteban y col. (2003) con modificaciones. El experimento empezó 2 h después de que comenzara el hemeroperiodo. Para ello, las raíces de las plántulas se lavaron con agua destilada durante 2 min. A continuación se cortaron e introdujeron en viales de 100 mL y éstos a su vez, dentro de recipientes de 500 mL de capacidad, junto con una disolución de incubación aireada que tenía la siguiente composición: 0,1 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM de

MES (ácido 2-[N-Morfolino]etanosulfónico) y 0, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2500 μM ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a pH 5,5. Las raíces se incubaron durante 20 min a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y en frío ($3 \pm 1^\circ\text{C}$). El primer intervalo de T^a se consiguió mediante la utilización de una bomba de calor o aire acondicionado. El segundo, se obtuvo al mantener la disolución de incubación sumergida en hielo y ubicada dentro de una cámara fría. Se realizaron 3 replicados por dosis de Cu y T^a y en cada vial se pusieron 3 raíces. Después del periodo de incubación, las raíces se lavaron durante 2 min en una disolución aireada que contenía 20 mM de Na_2EDTA y 5 mM MES (pH 5,5; 3°C). Una vez lavadas, se incubaron durante 15 min en una disolución de la misma composición ($< 4^\circ\text{C}$) para eliminar el metal no absorbido.

Para estudiar el efecto del Zn, Mn y Cd sobre la cinética de absorción de Cu se diseñaron otra serie de experimentos. El procedimiento seguido en cada uno de ellos y el número de replicados y de raíces por dosis fue similar al anterior, pero en este caso, a cada medio de incubación compuesto por 0,1 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM de MES y 0, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2500 μM ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a pH 5,5 se le añadió:

- 100 μM de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 2050 μM de Mn ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 62,5 μM de Cd (CdSO_4)

Por último, las muestras de raíces obtenidas de todos los experimentos de cinética se secaron con papel de filtro y se pesaron en fresco. Posteriormente, se sometieron a una digestión ácida y se determinaron las concentraciones de Cu, Zn, Mn y Cd mediante espectrofotometría de absorción atómica. Un esquema del procedimiento seguido se muestra en la Fig. 5.

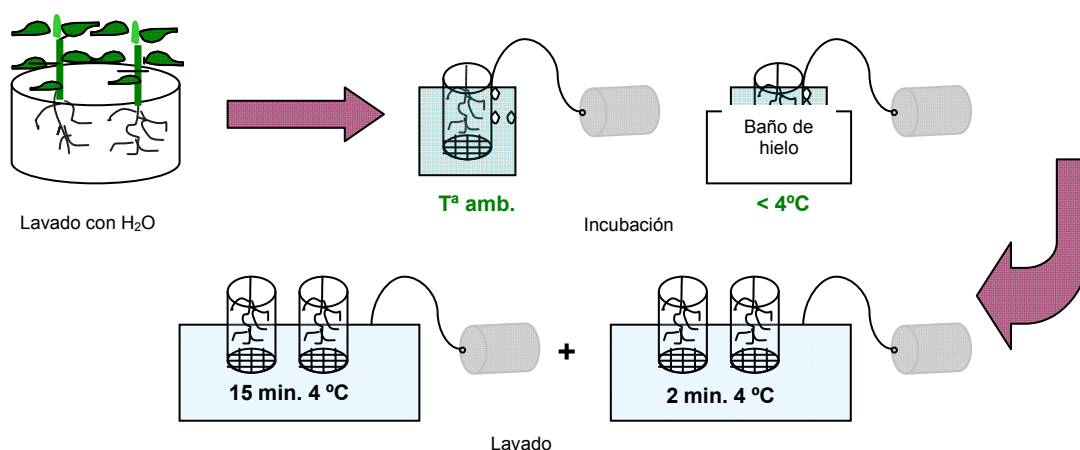


Fig. 5. Esquema del procedimiento seguido en los ensayos de cinéticas a corto plazo

6.2. Cinéticas de absorción de Cu a medio plazo y respuestas de estrés

Para el estudio de las cinéticas de absorción de Cu a medio plazo se procedió de la siguiente manera: Semillas de altramuces y soja desinfectadas y germinadas se transfirieron a unos recipientes de plástico y se cultivaron en cámara de crecimiento en hidroponía pura durante 7 días utilizando una DN control 20% diluida (Tablas 4 y 5). Pasado este tiempo, las plántulas se cultivaron utilizando el procedimiento descrito en el apartado 5.1. Las dosis de Cu utilizadas fueron 1,6 (control); 3, 5, 7, 10, 13 y 16 μM de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Se realizaron 4 replicados por dosis de Cu y en cada recipiente de cultivo se pusieron 3 plantas. La concentración y el porcentaje de Cu^{2+} disponible en la disolución nutritiva para las distintas dosis suministradas, calculada mediante el programa V-MINTEQ, así como la cantidad de Cu añadido por planta a lo largo del experimento, se muestra en la tabla siguiente:

Dosis de Cu (μM)	1,6	3	5	7	10	13	16
$[\text{Cu}^{2+}]$ disolución nutritiva (μM)	1,21	2,38	4,07	5,78	8,36	11,0	13,6
% Cu^{2+} disolución nutritiva	75,8	79,3	81,4	82,6	83,6	84,3	84,8
Cu añadido ($\mu\text{mol planta}^{-1}$)	1,11	2,08	3,46	4,85	6,92	9,00	11,08

A los 21 días de exposición a los tratamientos de Cu, se llevó a cabo la recogida del material vegetal. Las plantas se dividieron en raíz y parte aérea, y ésta a su vez, en hojas y tallos y se pesaron en fresco. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con una disolución de tween 80 (0,1% (v/v), durante 10 s, a continuación, con agua del grifo (2 min) y, por último, con agua destilada (2 min). Una parte del material vegetal fresco fue secado en estufa (Gallen Kamp, IH) durante 3 días a 80°C hasta pesada constante. Posteriormente, las muestras se pesaron en seco y se homogeneizaron en un molino de bolas (Recht, MM301) utilizando recipientes de óxido de zirconio, hasta la obtención de un polvo impalpable. Otra parte del material vegetal fresco fue introducido en N₂ líquido y almacenado en un congelador (MDF-U72V SANYO) a -78°C para su posterior análisis.

En las muestras se determinaron las variables de respuesta siguientes:

- Parámetros cinéticos de acumulación de Cu.
- Pesos frescos, secos y porcentajes de humedad en hojas, tallos y raíces.
- Concentración de Cu, Fe, Mn y Zn en muestras secas y homogeneizadas de hojas, tallos y raíces.
- Indicadores de estrés:
 - Tioles totales (-SH) y malondialdehído (MDA) en muestras frescas de hojas y raíces.
 - Polifenoles y flavonoides totales en muestras secas de raíces.

6.3. Experimentos dosis-respuesta: Ecotoxicidad y bioacumulación de Cu

Semillas de altramuza y soja desinfectadas y germinadas se transfirieron a unos recipientes de plástico y se cultivaron en cámara de crecimiento en hidroponía pura durante 7 días utilizando una DN control 20% diluida (Tablas 4 y 5). Pasado este tiempo, las plántulas se cultivaron utilizando el procedimiento descrito en el apartado 5.1. Las dosis de Cu utilizadas fueron 1,6 (control), 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128 y 144 µM de Cu (CuSO₄·5H₂O). Se realizaron 4 replicados por dosis de Cu y en cada

recipiente de cultivo se pusieron 3 plantas. La concentración y el porcentaje del Cu^{2+} disponible en la disolución nutritiva para las distintas tratamientos suministrados, calculados mediante el programa V-MINTEQ, así como la cantidad de Cu añadido por planta a lo largo del experimento, se muestra en la tabla siguiente:

Dosis de Cu (μM)	1,6	16	32	48	64	80	96	112	128	144
$[\text{Cu}^{2+}]$ disolución nutritiva (μM)	1,21	13,6	27,5	41,5	55,5	69,6	83,6	97,6	111,6	125,5
% Cu^{2+} disolución nutritiva	75,8	84,8	86,0	86,5	86,8	87,0	87,1	87,1	87,2	87,2
Cu añadido ($\mu\text{mol planta}^{-1}$)	0,74	7,38	14,77	22,15	29,54	36,92	44,31	51,69	59,08	66,46

A los 14 días de exposición a los tratamientos de Cu, se llevó a cabo la recogida del material vegetal. El procedimiento seguido en el muestreo y en el procesamiento de las muestras frescas y secas es similar al descrito en apartado 6.2.

En las muestras se determinaron las variables de respuesta siguientes:

- Absorción neta de Cu y parámetros ecotoxicológicos.
- Pesos frescos, secos y porcentajes de humedad en hojas, tallos y raíces.
- Concentración de Cu, Fe, Mn y Zn en muestras secas y homogeneizadas de hojas, tallos y raíces.
- Índices de absorción, eficacia y acumulación de Fe, Mn y Zn.
- Indicadores de estrés: Tioles totales (-SH) y malondialdehído (MDA) en muestras frescas de hojas y raíces.

6.4. Experimentos de normalidad y exceso de Cu - Alteraciones morfológicas, estructurales y fisiológicas

Semillas de altramuces y soja desinfectadas y germinadas se transfirieron a unos recipientes de plástico y se cultivaron en cámara de crecimiento en hidroponía pura durante 7 días utilizando una DN control 20% diluida (Tablas 4 y 5). Pasado este tiempo, las plántulas se cultivaron utilizando el procedimiento descrito en el apartado

5.1. Las dosis de Cu utilizadas fueron 1,6 (control) y 24 μM de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Se realizaron 4 replicados por dosis de Cu y en cada recipiente de cultivo se pusieron 3 plantas. Estos experimentos se repitieron dos veces. La concentración y el porcentaje del Cu^{2+} disponible en la disolución nutritiva para las distintas tratamientos suministrados, calculados mediante el programa V-MINTEQ, así como la cantidad de Cu añadido por planta a lo largo del experimento, se muestra en la tabla siguiente:

Dosis de Cu (μM)	$[\text{Cu}^{2+}]$ disolución nutritiva (μM)	% Cu^{2+} disolución nutritiva	Cu añadido ($\mu\text{mol planta}^{-1}$)
1,6	1,21	75,8	1,85
24	20,5	85,2	27,8

A los 35 días de exposición a los tratamientos de Cu, se llevó a cabo la recogida del material vegetal. En todos los casos, las plantas de altramuza y soja se dividieron en raíz y vástago, y a continuación, se procedió a medir la longitud. El procedimiento seguido en el muestreo y en el procesamiento de las muestras frescas y secas es similar al descrito en apartado 6.2.

En las muestras se determinaron las variables de respuesta siguientes:

- Diversos índices morfológicos de desarrollo foliar y radicular.
- Índices fisiológicos foliares: clorofilas, carotenoides y capacidad fotosintética.
- Pesos frescos, secos y porcentajes de humedad en hojas, tallos y raíces.
- Concentración de Cu, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Ni en muestras secas y homogeneizadas de hojas, tallos y raíces.

Además, en muestras “in vivo” de hojas y raíces se realizó un estudio estructural mediante microscopía electrónica de barrido a baja temperatura (LTSEM).

6.5. Experimentos normalidad y exceso de Cu - Fraccionamiento y localización subcelular

Semillas de altramuz y soja desinfectadas y germinadas se transfirieron a unos recipientes de plástico y se cultivaron en cámara de crecimiento en hidroponía pura durante 7 días utilizando una DN control 20% diluida (Tablas 4 y 5). Pasado este tiempo, las plántulas se cultivaron utilizando el procedimiento descrito en el apartado 5.1. Las dosis de Cu utilizadas fueron 1,6 (control) y 24 μM de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Se realizaron 4 replicados por dosis de Cu y en cada recipiente de cultivo se pusieron 3 plantas. Estos experimentos se repitieron tres veces.

A los 35 días de exposición a los tratamientos de Cu, se llevó a cabo la recogida del material vegetal. Para el estudio del fraccionamiento subcelular, las plantas de altramuz y soja se dividieron en raíz y vástago y éste último se subdividió en dos partes: inferior y superior. En altramuz, se consideraron hojas y tallos inferiores, los comprendidos entre la base del tallo y la cuarta ramificación lateral, el resto se denominaron superiores. Mientras que en soja, las hojas y tallos inferiores fueron los que se encontraban entre la base del tallo y la quinta ramificación lateral. A partir del quinto piso se consideraron hojas y tallos superiores. Las muestras se introdujeron en N_2 líquido y se almacenaron en un congelador (MDF-U72V SANYO) a -78°C .

Posteriormente, se realizó un fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial y se determinaron las concentraciones de K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn y Zn soluble, en la pared celular, plastos y membranas. Además, en muestras “in vivo” de hojas y raíces se llevó a cabo el microanálisis de elementos mediante microscopía electrónica de barrido a baja temperatura y difracción de rayos X (LTSEM-EDXMA).

6.6. Experimentos dosis-respuesta: Simbiosis *Rizobium*-Leguminosa

Semillas de altramuз y soja desinfectadas y germinadas se transfirieron a unos recipientes de plástico y se cultivaron en cámara de crecimiento en hidroponía con sustrato utilizando una DN control sin NO_3^- (20% diluida), cuya composición se muestra en las [Tablas 5 y 6](#). El procedimiento seguido para la inoculación de semillas y plántulas, así como para el cultivo se describe los apartados 4 y 5.2, respectivamente. Las dosis de Cu utilizadas fueron 1,6 (control), 48, 96 y 192 μM de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Se realizaron 4 replicados por dosis de Cu y en cada tiesto se pusieron 3 plantas. La concentración y el porcentaje del Cu^{2+} disponible en la disolución nutritiva para los distintos tratamientos suministrados, calculados mediante el programa V-MINTEQ, así como la cantidad de Cu añadido por planta a lo largo del experimento, se muestra en la tabla siguiente:

Dosis de Cu (μM)	1,6	48	96	192
$[\text{Cu}^{2+}]$ disolución nutritiva (μM)	1,21	41,5	83,6	178,5
% Cu^{2+} disolución nutritiva	75,8	86,5	87,1	93,0
Cu añadido ($\mu\text{mol planta}^{-1}$)	3,0	89,6	179,2	358,4

A los 35 días de exposición a los tratamientos de Cu, se llevó a cabo la recogida del material vegetal. Las plantas se dividieron en vástago (hojas y tallos), raíz y nódulos. El procedimiento seguido en el muestreo y preparación de las muestras es similar al descrito en el 6.2. Además se estudió la cantidad de Cu disponible y la retenida por el sustrato (perlita).

En las muestras vegetales se determinaron las variables de respuesta siguientes:

- Pesos frescos, secos y porcentajes de humedad en hojas, tallos, raíces y nódulos.
- Número de nódulos.

- Concentración de N y C en muestras secas y homogeneizadas de hojas, tallos, raíces y nódulos.
- Concentración de Cu, Fe, Mn, Zn y Ni en muestras secas y homogeneizadas de hojas, tallos, raíces y nódulos.
- Concentración de proteínas solubles y actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del N y C en nódulos.
- Localización subcelular (LTSEM-EDXMA) en nódulos.

Además, en muestras de hojas y nódulos realizó un estudio ultraestructural mediante microscopía óptica, electrónica de transmisión (TEM) y de barrido a baja temperatura (LTSEM).

6.7. Comparación de experimentos con y sin fijación de N₂

El diseño de estos experimentos se realizó siguiendo los procedimientos descritos en los apartados 6.4 y 6.6. Las dosis de Cu utilizadas en los experimentos sin FBN fueron 1,6 y 24 μM de Cu y 1,6 y 48 μM en los experimentos con FBN.

En las muestras se determinaron las variables de respuesta siguientes:

- Pesos frescos, secos y porcentajes de humedad en hojas, tallos y raíces.
- Concentración de N y C en muestras secas y homogeneizadas de planta
- Concentración de proteínas solubles y actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del N y C en hojas y raíces.
- Índices de absorción, eficacia y acumulación de Cu.
- Indicadores de estrés: Tioles totales (-SH) y malondialdehído (MDA) en muestras frescas de hojas y raíces.

7. Métodos analíticos y técnicas instrumentales

7. 1. Análisis mineral

La digestión ácida se realizó siguiendo la metodología propuesta por [Lozano-Rodríguez y col. \(1995\)](#). El material vegetal fresco o seco previamente pesado se introdujo en unos frascos de autoclave de 50 mL de capacidad junto con una mezcla de HNO_3 : H_2O_2 : H_2O (3:2:10, v:v:v) durante 30 min a 125°C y bajo una presión de 1,5 kPa. Finalmente, las muestras se filtraron y enrasaron. En la disolución obtenida se determinaron las concentraciones de Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, K, Ca, Mg y Cd mediante espectrofotometría de absorción atómica. Para cuantificar la concentración de K, Ca y Mg, previamente se añadió a las muestras y patrones una disolución eliminadora de interferencias químicas de ionización (0.5% de $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, 0.2% de CsCl y 5% de HCl en relación 1:10).

7.2. Adsorción/desorción de Cu por el sustrato de cultivo

La cantidad de Cu retenido por la perlita, así como el disponible para las plantas se ha determinado siguiendo la metodología descrita por [Vázquez y Carpena-Ruíz \(2005\)](#). El esquema general del procedimiento seguido se recoge en la [Fig. 6](#). Para ello, a 5 g de perlita se le añadió 40 mL de una disolución nutritiva que contenía 1,6, 48, 96 y 192 μM Cu, respectivamente. Las muestras se agitaron con un volteador (Heidolph) durante 24 h (700 rpm; T° ambiente). Posteriormente, se filtraron (Filter-Lab, S.A.; 90 mm), separando de esta forma la fracción soluble de Cu (Fracción I) del retenido por la perlita (Fracción II). El residuo sólido (Fracción II) obtenido se secó a T° ambiente y a continuación, se le añadió 40 mL de una disolución Soltampour (0,005M DTPA; 1N NH_4HCO_3 ; NH_4OH 1:1/ pH 7,6; [Soltanpour y Schwab, 1977](#)). Se repitió de nuevo el procedimiento anterior. En esta segunda fase, se obtuvo una fracción soluble que contenía el Cu desorbido por la perlita (Fracción III) y otra sólida (Fracción IV - Cu fuertemente retenido por la perlita). Esta última fracción se sometió a una

digestión ácida (apartado 7.1). La concentración de Cu presente en las fracciones I, III y IV, se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica.

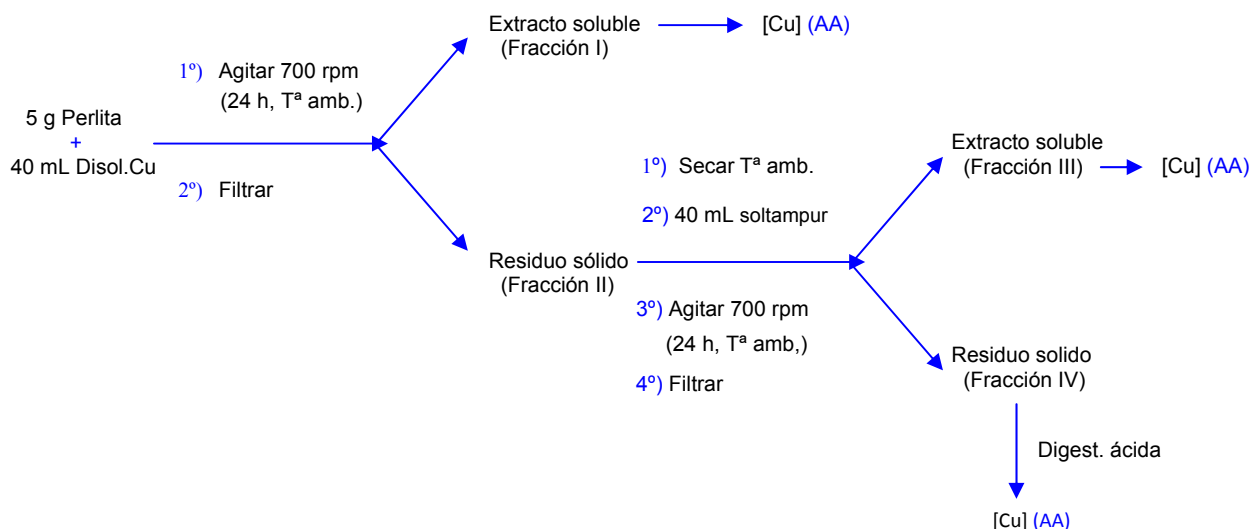


Fig.6. Esquema general del método de adsorción y desorción de Cu por el sustrato de cultivo

7.3. Fraccionamiento subcelular

La extracción de las distintas fracciones se realizó mediante una combinación de las metodologías propuestas por [Hernández y col. \(1998\)](#) y [Wu y col. \(2005\)](#). Un esquema de la metodología seguida se muestra en la [Fig. 7](#). Para ello, 5 g de material vegetal fresco (-78°C) se homogeneizaron en un mortero frío ($T^{\circ} < 4^{\circ}\text{C}$) con 5 mL de disolución compuesta por 50 mM de HEPES, 250 mM de sacarosa, 1,0 mM de DTT, 5,0 mM de ácido ascórbico y 1,0% p/v de PVPP (pH 7,5). El homogeneizado fue filtrado a vacío a través de tela de nylon ($240\ \mu\text{M}$), separando de esta manera, el residuo insoluble que contiene la pared celular (Fracción I) del filtrado.

A continuación, el filtrado se sometió a una centrifugación diferencial. En las muestras de hojas, la primera centrifugación se realizó a $1.500 \times g$, (10 min, 4°C) en una centrífuga Hettich, modelo Universal 320R. El precipitado resultante constituye la Fracción II, la cual, contiene los cloroplastos y en el caso de las muestras de raíces se efectuó a $2.500 \times g$, 20 min, 4°C obteniéndose los leucoplastos. La segunda centrifugación se llevó a cabo en una centrífuga Sorvall modelo RC-5C Plus ($10.000 \times$

g, 15 min, 4°C). De dicho proceso se consiguió otro precipitado (Fracción III) en el que se encuentran el resto de los orgánulos. El sobrenadante se centrifugó de nuevo utilizando una ultracentrífuga Kontron modelo Centrikon T-2070 (100.000 x g, 30 min, 4°C), obteniéndose un nuevo precipitado que contiene las membranas (Fracción IV) y un sobrenadante considerado la fracción soluble (Fracción V).

Los precipitados obtenidos de cada centrifugación fueron resuspendidos en 6 mL de la siguiente disolución (50 mM de HEPES, 250 mM de sacarosa, 1,0 mM de DTT, 5,0 mM de ácido ascórbico, 1,0% p/v de PVPP, pH 7,5), siendo almacenados a -20°C hasta su análisis posterior (Fracciones II, III, IV). La fracción I fue secada a 70°C, durante 3 días en estufa (Gallen Kamp, IH). Todas las fracciones obtenidas fueron sometidas a una digestión ácida y se determinaron las concentraciones de Cu, K, Ca, Mg, Fe, Mn y Zn mediante espectrofotometría de absorción atómica.

7.4. Espectrofotometría de absorción atómica

La absorción/emisión atómica es una técnica refinada de análisis que permite determinar la concentración de un elemento presente en disolución en forma de catión. El equipo utilizado ha sido Perkin-Elmer 4000 con llama oxidante de aire/acetileno y para cada uno de los elementos se utilizaron lámparas de cátodo hueco. Las condiciones de medida utilizadas aparecen en la [Tabla 8](#).

Tabla 8. Condiciones de medida en absorción atómica para cada elemento

Elemento			
	λ (nm)	Apertura de rendija	Intervalo de linealidad (ppm)
K ⁺	766,5	0,2	1 - 2 - 4
Ca ²⁺	422,7	0,7	1 - 5 - 10
Mg ²⁺	285,2	0,7	0,2 - 0,5 - 1
Fe ²⁺	252,3	0,2	2 - 4 - 10
Mn ²⁺	279,5	0,2	1 - 2 - 4
Cu ²⁺	324,8	0,7	1 - 5 - 10
Zn ²⁺	213,9	0,7	0,5 - 1 - 2
Ni ²⁺	232,0	0,2	0,5 - 1 - 2
Cd ²⁺	228,8	0,7	0,5 - 1 - 2

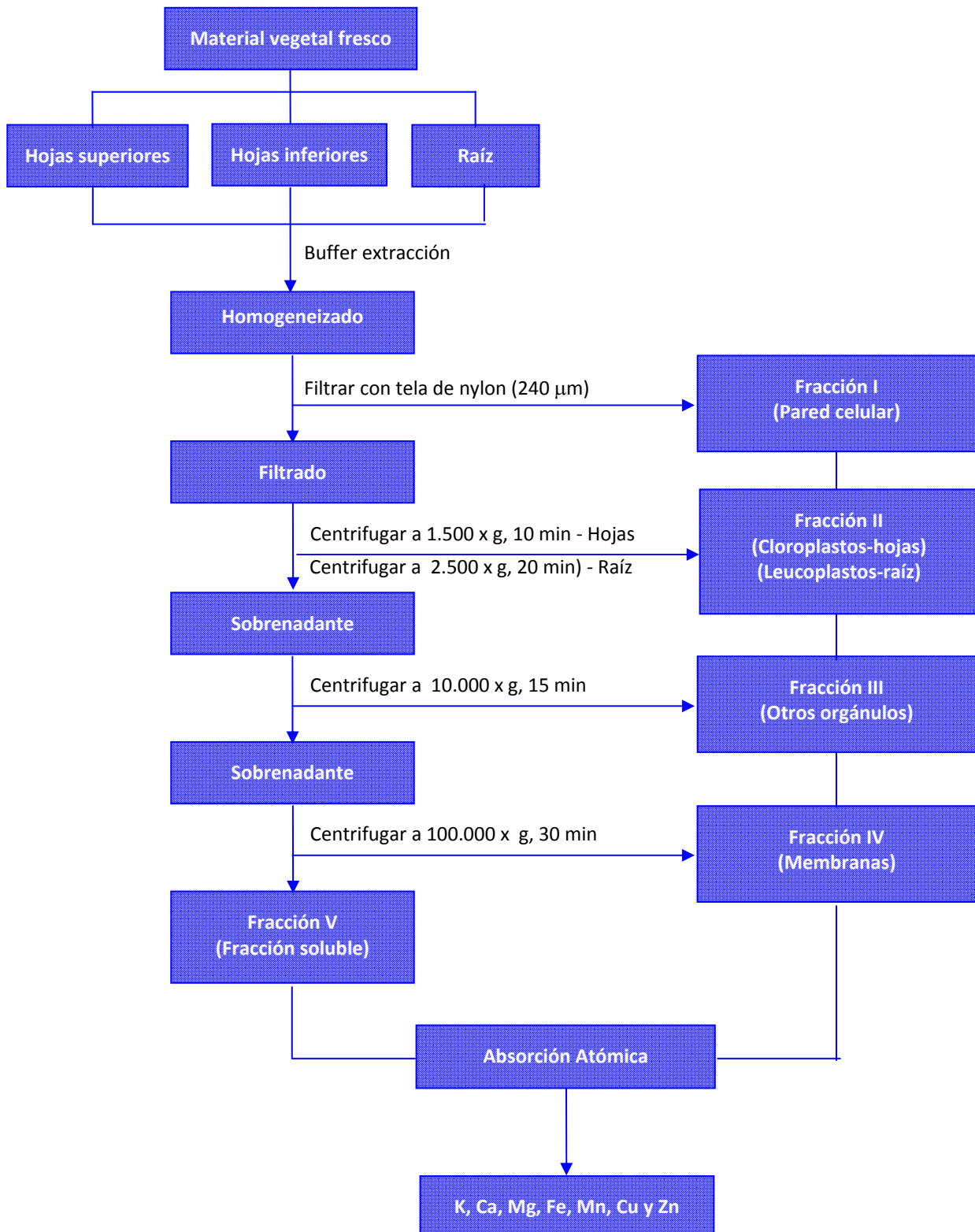


Fig. 7. Esquema de la metodología seguida para el estudio del fraccionamiento subcelular

7.5. Análisis químico elemental

La concentración de C y N presente en muestras de hojas, tallos y raíces se determinó mediante análisis químico elemental (LECO CHNS-932; LECO S.L., St. Joseph, Michigan, U.S.A). El análisis elemental es una técnica que proporciona el contenido total de C, H, N y S presente en un amplio abanico de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica, tanto sólidas como líquidas. El método analítico, consiste en la oxidación o combustión completa e instantánea de la muestra (1 mg MS) en condiciones óptimas de temperatura (T^a combustión: 1000°C y T^a reducción: 650°C) y atmósfera de oxígeno (20 y 10 cc) que transforma todos los compuestos en productos de combustión o gases simples (CO_2 , N_2 , H_2O (g) y SO_2). Para ello, existe un sistema de dosificación de O_2 mediante un controlador de flujo con secuencia de dosificación programable para garantizar una completa combustión, con un horno de oxidación hasta 1100°C y un horno de reducción hasta 950°C. Los gases resultantes de la combustión son transportados mediante un gas portador (He) a través de los tubos de combustión y reducción hasta llegar al sistema de detección. Este sistema tiene cuatro detectores individuales, tres de ellos de infrarrojo de estado sólido no dispersivo (C, H y S) y un cuarto de conductividad térmica diferencial para el N.

7.6. Indicadores de estrés

Se determinaron clorofilas y carotenoides en muestras fresca de hojas y -SH totales y MDA en muestras de hojas y raíces almacenadas en congelador a -78°C y homogeneizadas en N_2 líquido utilizando un mortero frío (< 4°C). La concentración de polifenoles totales y flavonoides se realizaron en muestras secas de raíces.

➤ *Tioles totales (-SH)*

La determinación de -SH se realizó siguiendo la metodología propuesta por [Jocelyn \(1987\)](#). Para ello, a 100 mg de material vegetal se le añadió 0,4 mL de una disolución extractora compuesta por NaOH (1 M) y NaBH_4 (1 mg mL⁻¹) más 0,2 mL de

agua desionizada. La muestra se centrifugó ($11.000 \times g$, 5 min) en una centrífuga Hettich, modelo Universal 320R. Acto seguido, se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se le agregó 0,1 mL de HCl al 35% (v/v) y se volvió a centrifugar a $11.000 \times g$ durante 5 min. A continuación, se añadió 0,5 mL del sobrenadante obtenido a 0,5 mL del reactivo de Ellman (DTNB: 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico). Dicho reactivo de color se hizo en el momento, a partir de 300 μM de DTNB disueltos en tampón fosfato 0,5 M (pH 7,2). Este tampón estaba compuesto por 1 M de Na_2HPO_4 (38,7% v/v) y 1 M de NaH_2PO_4 (11,3% v/v). Al mismo tiempo, se preparó una recta de calibrado que contenía los mismos reactivos excepto la muestra, y en su lugar utilizaron distintas concentraciones de glutathion (GSH; 0-100 nmoles). Finalmente, se dejó desarrollar el color durante 2 min en un baño de agua a 30°C y se midió la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro automático UV-visible (Shimadzu, UV-160A).

➤ *Malondialdehído (MDA)*

La cantidad de peroxidación de lípidos de las muestras fue estimada como MDA siguiendo la metodología propuesta por [Lozano-Rodríguez y col. \(1997\)](#). Para ello a 100 mg de material vegetal fresco y homogeneizado se le añadió 1,0 mL de reactivo TCA-TBA-HCl (15% (p/v) TCA; 0,37% (p/v) TBA y 0,25 mM HCl). El extracto fue incubado en un baño de arena (90°C , 30 min). Posteriormente, se introdujo en un baño de hielo para enfriarlo y a continuación, el precipitado floculante obtenido fue centrifugado ($11.000 \times g$, 10 min) en una centrífuga Hettich, modelo Universal 320R. La absorbancia del sobrenadante se midió a 535 nm y la turbidez no específica fue corregida restando la absorbancia a 600 nm mediante el empleo de un espectrofotómetro automático UV-visible ((Shimadzu, UV-160A). La concentración de MDA se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

➤ *Clorofilas y carotenoides*

La extracción se llevó a cabo mediante la homogenización de 200 mg de material fresco de hojas con 10 mL de acetona al 80% (v/v) en mortero frío. El

extracto fue decantado y filtrado con papel Whatman nº 1. El residuo se extrajo de nuevo repitiendo la operación hasta que quedó incoloro y se enrasó a 25 mL con acetona al 80%. A continuación se leyeron las absorbancias del extracto a 470, 646 y 663 nm en un espectrofotómetro automático UV-visible (Shimadzu, UV-160A). La concentración de estos pigmentos ha sido estimada según [Wellburn \(1994\)](#):

$$\text{Chla (mg L}^{-1}\text{)} = 12,21A_{663} - 2,81A_{646}$$

$$\text{Chlb (mg L}^{-1}\text{)} = 20,13A_{646} - 5,03A_{663}$$

$$\text{Carotenoides}_{\text{totales}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (1000A_{470} - 3,27 \text{ Chla} - 104 \text{ Chlb}) / 198$$

➤ *Polifenoles y flavonoides*

Para llevar a cabo la extracción de polifenoles y flavonoides se pesaron 200 mg de material vegetal seco pulverizado y tamizado (< 0,2 mm) y se introdujeron en frascos de plástico herméticos junto con 10 mL de metanol acidulado (0,1% de HCl). Posteriormente, se realizó una primera extracción mediante agitación orbital (agitador Reax2 de 33W) a temperatura ambiente (4 h). Se decantó el sobrenadante, se añadieron otros 10 mL de metanol y se repitió la extracción (4 h). Los extractos se filtraron, reunieron y enrasaron a 25 mL con metanol (0,1% de HCl).

Para la determinación de polifenoles totales se siguió la metodología propuesta por [Singlenton y Rossi \(1965\)](#). El método se basa en la reducción del complejo formado por los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico (Folin-Ciocalteu) a un óxido de molibdeno y wolframio de color azul, cuya absorbancia se mide a 685 nm. Para ello, se toman 0,250 mL de muestra, 3,75 mL de agua destilada, 0,250 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y, por último 2 mL de Na₂CO₃ al 20%, se centrifuga (2500 rpm, 4 min) y se introduce en un baño de agua (40°C; 40 min). Posteriormente, se mide la absorbancia a 685 nm en un espectrofotómetro automático UV- visible (Shimadzu, UV-160A). La curva patrón se realiza a partir de disoluciones de concentraciones crecientes de ácido gálico.

Para la determinación de flavonoides totales se siguió el método propuesto por [Lindoo y Caldwell \(1978\)](#). Para ello se midió la absorbancia de los extractos metanólicos a 300 nm. La concentración de flavonoides se expresó como $A_{300\text{ nm}} \text{ g}^{-1}$ M.S.

7.7. Determinación de proteínas solubles y actividades enzimáticas

La determinación de proteínas y actividades enzimáticas se realizó en muestras frescas de hojas y raíces de plantas de altramuz y soja inoculadas y sin inocular, así como en los nódulos.

➤ *Método de extracción*

Para determinar la concentración de proteínas y las actividades enzimáticas se llevó a cabo primeramente una extracción de la fracción vegetal. Sobre un mortero de mano enfriado previamente en nevera y luego con N_2 líquido, se homogeneizó la muestra (0,100 g) junto con 0,02 g de PVPP g^{-1} y 5 mL de buffer de extracción compuesto por 50 mM MOPS, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 10 mM DTT y 10 mM β -mercapto-etanol (pH 7,0). Posteriormente, el homogeneizado obtenido se centrifugó a 4°C y 14000 rpm (Hettich, Universal 320R) durante 30 min obteniendo el extracto crudo.

➤ *Desalado de la muestra*

Los extractos de la fracción vegetal se desalaron equilibrándolos previamente con un buffer de desalado. Para ello, sobre una probeta de 100 mL se añadió 20 mL del buffer de desalado (250 mM MPOS, 25 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, pH 7,0) y se enrasó a 100 mL con el gel BioRad-Gel P-6-DG. Se mezcló por volcado y se dejó reposar durante 10 min. En la punta de una jeringa de 5 mL, se puso un filtro de Miracloth y se llenó con el gel. A continuación, se centrifugó a 4°C y 1400 rpm

(Hettich, Universal 320R) durante 1 min para retirar el exceso de tampón. Una vez centrifugado el gel, se le añadió primero 300 μL de la muestra del extracto crudo y después 120 μL de buffer de desalado, y se volvió centrifugar (1800 rpm, 4°C, 2 min). Finalmente, se recogió la muestra filtrada y se midió el volumen obtenido.

➤ *Proteínas*

La cuantificación de las proteínas solubles se llevó a cabo siguiendo el método descrito por [Bradford \(1976\)](#). La concentración de la proteína se estimó utilizando una recta patrón realizada con BSA (Seroalbúmina bovina 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en el intervalo comprendido entre 0-60 μg . A cada pocillo de la microplaca se le añadió los μL de BSA stock y de agua milli Q correspondientes, más los 200 μL de Bradford como se muestra a continuación:

<u>μg proteína</u>	<u>μL BSA stock</u>	<u>μL H₂O milli Q</u>	<u>μL Bradford</u>
0	0	60	200
0,5	5	55	200
1	10	50	200
2	20	40	200
3	30	30	200
4	40	20	200
5	50	10	200
6	60	0	200

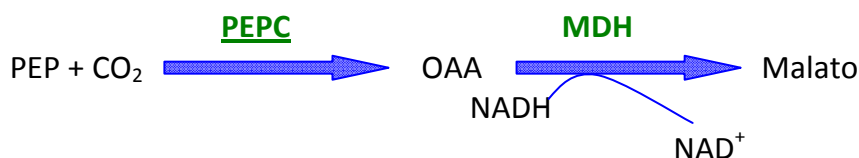
Asimismo, se adicionó 60 μL del extracto crudo o desalado de la fracción vegetal (diluida 1:100 y 1:50) más 200 μL de Bio-Rad R. Se dejó desarrollar el color durante 5 min. La coloración azul se midió en un lector de microplacas modelo Molecular Devices SpectraMax 340 PC, a 595 nm.

➤ *Actividades enzimáticas*

Las actividades enzimáticas se han valorado por medio de la oxidación o reducción de NAD(P)H/NAD(P)⁺ producida en la propia reacción o en una reacción acoplada. La valoración en el extracto crudo o desalado de las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de N o C, se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 340 nm durante 30 min y 30°C mediante el empleo de un lector de microplacas (SpectraMAX, 340 PC). La mezcla de reacción utilizada varió para cada enzima y el análisis se ha realizado en un volumen final de 250 µL de los diferentes medios de reacción.

Enzimas del metabolismo del C

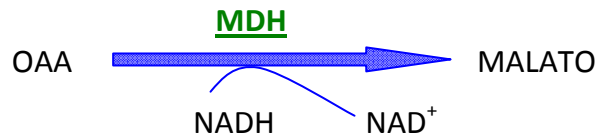
- La determinación de la actividad PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa; EC 4.1.1.31) se basa en la medida de NADH consumido en la siguiente reacción:



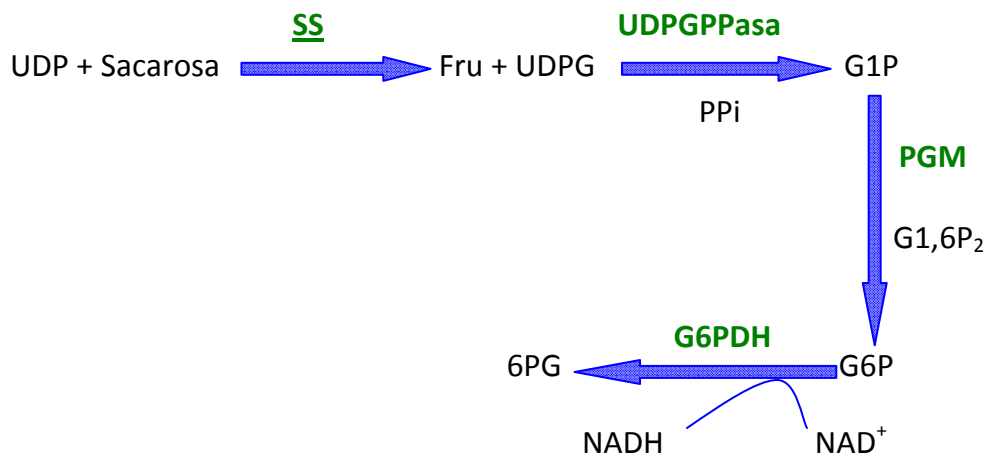
La PEPC se determinó siguiendo el método propuesto por [González y col. \(1995\)](#). Para ello, se ha empleado una mezcla de reacción compuesta por el buffer PEPC (50 mM MBM; 5 mM MgCl₂/ pH 8,0); 20 mM NADH; 100 mM PEP, 200 mM Na₂CO₃ y 0,9 unidades de MDH malato deshidrogenasa. La reacción tuvo lugar al suministrar 10 µL del extracto crudo.

- La determinación de la actividad MDH (malato deshidrogenasa; EC 1.1.1.37) se realizó siguiendo el método propuesto por [Gordon y Kessler \(1990\)](#). El medio de reacción contenía 50 mM Mes-Bicina-MOPS (MBM); 5 mM MgCl₂; 20 mM NADH (pH

8,0) y el extracto desalado. La reacción se inició por la adición de 0,025 M de ácido oxalacético (OAA). La medida de la actividad enzimática MDH se basa en la determinación del NADH oxidado según la siguiente reacción:



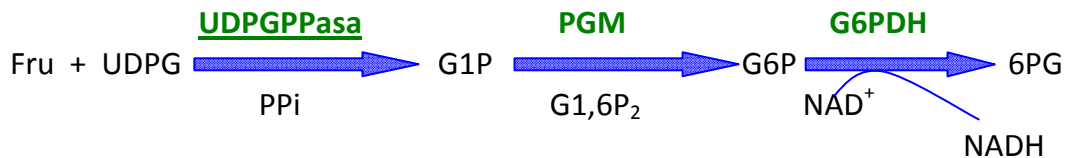
- La determinación de la actividad SS (sacarosa sintasa; E.C.2.4.1.13) se realizó siguiendo el método propuesto por [González y col. \(1998\)](#). El método se basa en la medida del NADH producido en la reacción siguiente:



La reacción comenzó al añadir 10 µL del extracto desalado a un medio de reacción constituido por un buffer SS (50 mM TRIS; 5 mM MgCl₂; 20 mM KCl/ pH 7); 1 M sacarosa; 100 mM P_i; 10 mM G1,6P₂; 100 mM NAD; 100 mM UDP; 10 unidades de UDPGPPasa; 10 unidades de PGM y 10 unidades de G6PDH.

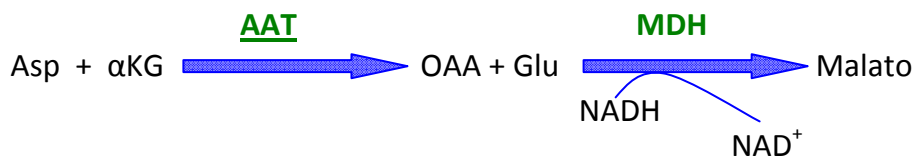
- La determinación de la actividad UDPGPPasa (UDP-glucosa pirofosforilasa; E.C.2.7.7.9) se realizó siguiendo el método propuesto por [Gordon y col. \(1990\)](#). El

medio de reacción consistió en el buffer UDPGPPasa (50 mM MBM; 5 mM MgCl_2 ; 20 mM KCl/pH 7,5); 100 mM NAD; 100 mM PPI ; 10 mM de G1,6P_2 ; 100 mM UDPG; 10 unidades de PGM y 10 unidades de G6PDH. La reacción se inició al añadir 10 μL del extracto desalado. Se midió el NAD^+ reducido en la siguiente reacción:

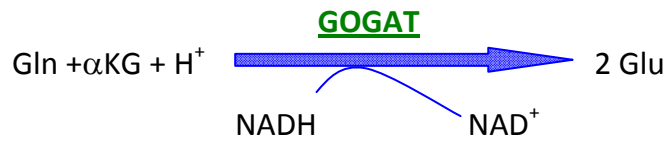


Enzimas del metabolismo del N

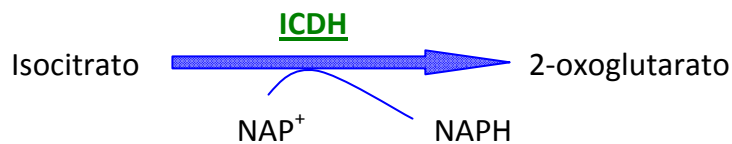
- La determinación de la actividad AAT (aspartato aminotransferasa; E.C.2.6.1.1) se realizó siguiendo el método descrito por [González y col. \(1995\)](#). La mezcla de reacción contenía el buffer AAT compuesto por 50 mM MBM; 5 mM MgCl_2 / pH 8,0; 20 mM NADH; 500 mM Asp; 1,5 mM piridoxal fosfato; 0,9 unidades de malato deshidrogenasa y 5 μL del extracto desalado. La reacción comienza al añadir 10 μL de 62,5 mM αKG . La medida de la actividad enzimática AAT se basa en la oxidación del NADH según la siguiente reacción:



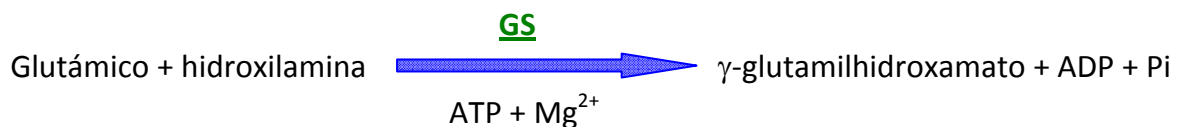
- La determinación de la actividad GOGAT (glutamato sintasa; E.C.1.4.1.13) se realizó siguiendo el método descrito por [Groat y Vane \(1981\)](#). El medio de reacción estaba compuesto por el buffer GOGAT (100 mM Bicina; 10 mM DTT/ pH 8,6); 20 mM NADH y 100 mM αKG y 12,5 μL de extracto desalado. La reacción se produce al suministrar 100 mM de L-Glutamina. La medida de la actividad enzimática se basa en la oxidación del NADH producido durante la siguiente reacción:



- La determinación de la actividad ICDH (isocitrato deshidrogenasa; E.C.1.1.1.41) se basa en el método propuesto por [Ferri y col. \(2000\)](#). Para ello, a 10 μL del extracto desalado se le adicionó un medio de reacción constituido por un buffer ICDH (100 mM bicina; 5 mM MgCl_2 / pH 8,5); 100 mM Isocitrato; 100 mM NADP^+ . En este caso, se analizó el NADPH producido en la siguiente reacción:



- La determinación de la actividad GS (glutamina sintetasa; E.C.6.3.1.2). realizó siguiendo el método descrito [González y col. \(1995\)](#). El método se basa en la formación de γ -glutamilhdroxamato según la siguiente reacción:



Para ello, se incubó durante 30 min a 30°C el extracto desalado de la muestra junto con el buffer GS (100 mM Imidazol; 40 mM MgCl_2 ; 50 mM hidroxilamina/pH 7,2); 0,5 M Na-Glutamato y 50 mg/8 mL ATP. Pasado ese tiempo, se añadió la disolución stop ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20g/250 mL; HCl 35%; TCA 10%). Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (SpectraMAX, 340 PC).

A su vez se prepararon varios blancos:

- Blanco matriz a tiempo cero: se añadió el buffer de extracción, buffer GS y una disolución stop y se midió la absorbancia.
- Blanco matriz a 30 min: el buffer de extracción junto con el buffer GS se incubaron durante 30 min en un baño de agua a 30°C. Pasado este tiempo se añadió la disolución stop y se leyó la absorbancia.
- Blanco de muestra a tiempo cero: constituido por la muestra, el buffer GS y la disolución stop. La absorbancia se midió en el momento que se adicionaron.
- Blanco de muestra a 30 min: se adicionó la muestra junto con el buffer GS y la disolución stop. A continuación se incubó a 30°C durante 30 min. Después se midió la absorbancia.

7.8. Microscopía óptica y electrónica de transmisión

Para la observación (ultra)estructural de muestras de hojas y nódulos mediante el empleo de microscopía óptica y electrónica de transmisión (TEM), se procedió de la siguiente forma:

➤ Inclusión

En primer lugar el material vegetal fresco de hojas y nódulos fueron seccionados (2-3 mm) e inmediatamente procesados tras su separación de la planta. Los segmentos de hojas y nódulos cortados, se fijaron inmediatamente con formaldehído 4% más glutaraldehído 5% en tampón cacodilato sódico 0,05 M, pH 7,4 durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación las muestras se desgasificaron en dos periodos de 10 min. Se renovó el fijador (1,5 h, 4°C) y se lavaron tres veces con tampón cacosacarosa (30 min; 4°C). Acto seguido, se realizó la posfijación con tetróxido de osmio 1% durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se lavaron en tampón cacosacarosa, se deshidrataron en una serie de disoluciones de etanol con un porcentaje de este reactivo creciente y se infiltraron

progresivamente en la resina LR White (London Resin Company), todo ello a 4°C, como aparece en la tabla siguiente:

Procedimiento			
	Tampón	Tiempo	Temperatura
1 ^{er} lavado	Cacosacarosa	5 min	4°C
2 ^o lavado	Cacosacarosa	5 min	4°C
Etanol 30%		10 min	4°C
Etanol 50%		10 min	4°C
Etanol 70%		10 min	4°C
Uranilo 1%		noche	4°C
Etanol 90%		10 min	4°C
Etanol 96%		30 min	4°C
Etanol 100%		1 h	4°C
Etanol 100%		1 h	4°C
Etanol/ LR White (3:1)		3 h	4°C
Etanol/ LR White (1:1)		noche	4°C
Etanol/ LR White (1:3)		3 h	4°C
LR White		48 h (1 cambio/día)	4°C

Finalmente, las muestras se incluyeron individualmente en cápsulas de gelatina con resina LR White y se taparon procurando que quedara la menor cantidad de aire posible, para su correcta polimerización. Las cápsulas se mantuvieron verticalmente a 60°C durante 24 h y a continuación, se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

➤ *Microscopía óptica*

Las secciones, previamente incluidas en resinas LR White, se cortaron con el ultramicrotomo REICHERT ULTRACUT S (Leica) provisto con cuchillas de diamante Diatome 45°. En los estudios de microscopía óptica, las observaciones de cortes semifinos (1 µm), de nódulos y hojas se realizaron en un microscopio óptico Zeiss Axiophot con sistema fotográfico integrado, perteneciente al Instituto de Ciencias Agrarias del CSIC de Madrid. Los cortes montados con unas gotas de agua bidestilada sobre portaobjetos de vidrio tratados con adhesivo de Haupt, fueron teñidos durante 5-10 min con azul de toluidina 1%, conteniendo borato sódico (1:1) y con fucsina.

➤ *Microscopía electrónica de transmisión*

Para los estudios de microscopía electrónica de transmisión se emplearon igualmente secciones incluidas en resinas LR White. Las secciones ultrafinas de aproximadamente 70 nm se realizaron en un ultramicrotomo REICHERT ULTRACUT S (Leica), se recogieron sobre rejillas de cobre o de níquel, de 150-200 ventanas y fueron observadas en un microscopio electrónico STEM LEO910 con una cámara digital integrada Gatan Bioscan (modelo 792) perteneciente al Instituto de Ciencias Agrarias del CSIC.

7.9. Microscopía electrónica de barrido a baja temperatura

Esta técnica instrumental se utilizó en secciones de 3-4 mm² procedentes de hojas adultas bien desarrolladas, de nódulos de igual tamaño presentes en la raíz principal y de raíces decapitadas a 5 mm de ápice. Las muestras fueron fijadas mecánicamente con un adhesivo especial Gurr (Compuesto O.C.T.; BDH) a un portaobjetos de aluminio para microscopía de barrido y transferidos al sistema de criotransferencia (Oxford-CT1500). Rápidamente las muestras fueron congeladas por inmersión en N₂ líquido y transferidas a la unidad de preparación del microscopio. En el interior de esta cámara las muestras ultracongeladas fueron crio fracturadas con una aguja de acero inoxidable previamente enfriada y después transferidas directamente al microscopio donde se deshidrataron a -90°C durante 2 min. Después de la sublimación, las superficies fracturadas fueron recubiertas con oro y transferidas a la cámara de observación del microscopio electrónico de barrido Digital Scanning Microscope DSM 960 Zeiss utilizándose los detectores de electrones secundarios y retrodispersados (B.S.E., Back Scattered Electrons) para la observación directa de las muestras.

A partir de la microscopía electrónica de barrido combinada con microanálisis de rayos X (LTSEM/EDXMA) se puede determinar los elementos que están presentes en los diferentes tejidos de la muestra y, aproximadamente, la proporción en la que

se encuentran. EDXMA se realizó en frío (-150 °C a -155 °C) y directamente sobre la muestra fracturada. Se utilizaron solamente superficies lisas como propone [Hess \(1980\)](#). Se ha usado un voltaje de aceleración de 20 kV y una distancia de trabajo de 25 mm. El analizador utilizado ha sido un Link Isis, Oxford, con una resolución 133 eV. Se realizó el procedimiento de corrección ZAF (número atómico, absorción y fluorescencia) por Link Isis versión (3,2 Oxford, Reino Unido) para la obtención del análisis semi-cuantitativo de elementos.

8. Cálculos y métodos estadísticos

8.1. Cálculos

➤ *Cálculos de los parámetros cinéticos*

Para determinar los parámetros cinéticos de absorción de elementos, se utilizó el programa informático SigmaPlot 9.0, el cual permite ajustar los datos obtenidos a una ecuación de Michaelis-Menten.

➤ *Índices de absorción, acumulación y translocación*

Se han realizado diversos cálculos para determinar la absorción neta de elementos ([Zornoza y col., 2002](#)), así como diversos índices de eficacia, acumulación, translocación y relación entre la concentración del metal en parte aérea y raíz ([Greger y col., 2005](#)):

$$\text{Absorción neta } (\mu\text{mol planta}^{-1} \text{ día}^{-1}) = \frac{\text{Contenido total en planta } (\mu\text{mol planta}^{-1})}{\text{Días de tratamiento}} \quad [1]$$

$$\text{Acumulación efectiva total } (\%) = \frac{\text{Contenido total en planta } (\mu\text{g})}{\text{Total añadido } (\mu\text{g})} \times 100 \quad [2]$$

$$\text{Acumulación efectiva vástago (\%)} = \frac{\text{Contenido total en vástago } (\mu\text{g})}{\text{Total añadido } (\mu\text{g})} \times 100 \quad [3]$$

$$\text{Translocación (\%)} = \frac{\text{Contenido total en vástago } (\mu\text{g})}{\text{Contenido total en planta } (\mu\text{g})} \times 100 \quad [4]$$

$$\text{Relación de [Cu] entre parte aérea y raíz (\%)} = \frac{[\text{Cu}]_{\text{vástago}} (\mu\text{g g}^{-1})}{[\text{Cu}]_{\text{raíz}} (\mu\text{g g}^{-1})} \times 100 \quad [5]$$

➤ *Medidas cuantitativas del crecimiento*

Se han realizado diversos cálculos para determinar la tasa de crecimiento relativo e inhibición del crecimiento, así como otros parámetros morfológicos y fisiológicos relacionados con el desarrollo foliar y radicular.

Tasa de crecimiento relativo total (RGR) fue calculada según [Hunt \(1982\)](#):

$$\text{RGR (mg g}^{-1} \text{ día}^{-1}) = \frac{\text{Ln } P_{\text{MS1}} - \text{Ln } P_{\text{MS0}} (\text{g})}{t_1 - t_0 (\text{día})} \quad [6]$$

Tasa de inhibición del crecimiento (IC) fue calculada como:

$$\text{IC (\%)} = \frac{\text{MF}_{\text{control}} - \text{MF}_{\text{Cu}} (\text{g})}{\text{MF}_{\text{control}} (\text{g})} \times 100 \quad [7]$$

Donde: P_{MS0} es el peso del vástago o la raíz a tiempo 0 y P_{MS1} es a los 35 días de exposición al Cu. $\text{MF}_{\text{control}}$ y MF_{Cu} son el peso fresco del vástago o la raíz de las plantas control y de las tratadas, respectivamente.

- Índices de desarrollo foliar

El área foliar (LA) se ha calculado a partir de la hojas escaneadas mediante el empleo de la aplicación informática Foliárea ([Muñoz-Guerra, 2002](#)).

Tasa de asimilación neta (NAR) calculada según [Hunt y col. \(2002\)](#)

$$NAR (g m^{-2} día^{-1}) = \frac{RGR (mg g^{-1} día^{-1})}{LAR (m^2 kg^{-1})} \quad [8]$$

Proporción del área foliar (LAR) calculada según [De Groot \(2002\)](#)

$$LAR (m^2 kg^{-1} MS total) = \frac{LA (m^2)}{MS_{total} (kg)} \quad [9]$$

Área foliar específica (SLA) calculada según [Evans \(1972\)](#)

$$SLA (m^2 kg^{-1} MS hoja) = \frac{LA (m^2)}{MS_{hojas} (kg)} \quad [10]$$

Proporción de peso seco localizado en las hojas (LMR) calculada según [Evans \(1972\)](#)

$$LMR (g hoja g^{-1} planta) = \frac{MS_{hojas} (g)}{MS_{total} (g)} \quad [11]$$

Espesor de las hojas (LT) calculada según [De Pinheiro y Marcelis \(2000\)](#)

$$LT (kg MS hoja m^{-2}) = \frac{MF_{hoja} (kg)}{LA (m^2)} \quad [12]$$

Donde: LA es el área foliar, MS_{total} el peso seco total de la planta, MS_{hojas} y MF_{hoja} , son el peso seco y fresco de las hojas, respectivamente. Se considera que LA,

LAR, SLA, LMR y LT son parámetros morfológicos de las hojas, mientras que el NAR es un componente fisiológico del crecimiento.

- Índices de desarrollo radicular

Tasa de elongación relativa de la raíz (RGR) calculada según [Sayyari-Zahan y col. \(2009\)](#)

$$\text{RGR (cm cm}^{-1} \text{ día}^{-1}) = \frac{\ln (RL_1 - RL_0)}{t_1 - t_0} \quad [13]$$

Proporción de peso seco localizado en las raíces (RMR) calculada según [Hunt y col. \(2002\)](#)

$$\text{RMR (g raíz g}^{-1} \text{ planta)} = \frac{MS_{\text{raíz}} \text{ (g)}}{MS_{\text{total}} \text{ (g)}} \quad [14]$$

Radio de la raíz (r_0) calculado según [Sayyari-Zahan y col. \(2009\)](#)

$$r_0 \text{ (cm)} = \sqrt{\frac{MF_{\text{raíz}} \text{ (g)}}{\pi \times RL_1 \text{ (cm)}}} \quad [15]$$

Área de la raíz (RA) calculada según [Sayyari-Zahan y col. \(2009\)](#)

$$\text{RA (cm}^2 \text{ planta}^{-1}) = RL_1 \times 2\pi \times r_0 \quad [16]$$

Siendo MS_{total} el peso seco total de la planta; $MS_{\text{raíz}}$ y $MF_{\text{raíz}}$ se refieren al peso seco y fresco de la raíz, respectivamente; RL_0 es la longitud de la raíz a tiempo 0 y RL_1 es a los 35 días de exposición al Cu.

➤ *Otros índices*

A partir de las muestras de hojas previamente escaneadas, se ha calculado también el índice de capacidad fotosintética, el área verde, amarilla y roja foliar, mediante el empleo de la aplicación informática Foliárea ([Muñoz-Guerra, 2002](#)).

Fijación específica de nitrógeno (SNF) estimado según [Vieira y col. \(2007\)](#)

$$\text{SNF (mg N asimilado mg MS nódulo}^{-1}) = \frac{\text{Concentración N asimilada (mg)}}{\text{MS}_{\text{nódulo}} \text{ (mg)}} \quad [17]$$

8.2. Métodos estadísticos

Para la interpretación estadística de los resultados obtenidos experimentalmente se procedió a realizar cálculos de estadística descriptiva (media aritmética y error típico de la media), análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la correlación lineal entre distintas variables ([Bender y col. 1989](#)). Los cálculos se han realizado mediante el programa estadístico SPSS 17,0.

✓ Estadística descriptiva

$$\text{Media aritmética} \rightarrow \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$\text{Desviación típica} \rightarrow DT = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Error típico de la media} \rightarrow ET = \frac{DT}{\sqrt{n}}$$

Donde n es el número de replicados

✓ Anova de un factor

Este método estadístico se basa en la aplicación del modelo matemático siguiente:

$$x_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Donde:

μ : es la media general

T_i : es el efecto debido a los distintos tratamientos

e_{ij} : es el efecto debido al error

La descomposición de varianza general queda recogida en la tabla siguiente:

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIAS DE CUADRADOS
TRATAMIENTOS	$(i - 1)$	$\sum_j \frac{x_{i.}^2}{j} - \frac{x_{..}^2}{ij}$	$\frac{SC_T}{(i - 1)} = MC_T$
ERROR	$i(j - 1)$	$\sum x_{ij}^2 - \frac{x_{..}^2}{ij}$	$\frac{SC_e}{i(j - 1)} = MC_e$

El cociente MT_T / MC_e se distribuye como una F con $(i - 1)$ grados de libertad en el numerador e $i(j - 1)$ grados de libertad en el denominador.

Donde:

i : es el número de tratamientos

j : es el número de replicados

Las medias procedentes de los tratamientos se han comparado utilizando el *test* de la mínima diferencia significativa (MDS) para medias de dos grupos y el *test* de Duncan para más de dos grupos. En ambos casos la probabilidad fue $P < 0,05$.

✓ Correlación lineal

En algunos casos se ha calculado la correlación lineal entre distintas variables r:

$$r = \frac{Cov_{(XY)}}{\sqrt{V_x \cdot V_y}} \quad (-1 \leq r \leq 1)$$

Donde:

$Cov_{(XY)}$: covarianza de X e Y

V_x : varianza de X

V_y : varianza de Y

Conviene recordar que, aunque r es el coeficiente de correlación, r^2 es la cantidad que da la fracción de la suma de cuadrados total atribuible al ajuste lineal. Para comprobar si r es significativamente diferente de cero a un nivel de probabilidad α se ha procedido de la siguiente forma:

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIAS DE CUADRADOS
CORRELACIÓN	1	r^2	r^2
RESIDUO	$n - 2$	$1 - r^2$	$\frac{1 - r^2}{n - 2}$
TOTAL	$n - 1$	1	

El cociente $r^2(n - 2) / 1 - r^2$ se distribuye como una F_{n-2}^1 .

A black and white micrograph showing a cross-section of a plant stem. The image displays numerous vascular bundles arranged in a ring. Each bundle consists of a central xylem region with large, thick-walled vessels and a surrounding phloem region with smaller cells. The bundles are separated by a layer of small, thin-walled cells. The overall structure is circular and symmetrical.

Resultados y Discusión:

Capítulo I

1.- Resultados de cinéticas de absorción de Cu por raíces aisladas de altramuza y soja

1.1. Método de lavado para desorber Cu

Previo a los ensayos de cinética, se realizó un experimento para seleccionar la composición del medio de lavado más adecuada para eliminar la mayor parte del Cu no absorbido por las raíces. La planta seleccionada para el estudio fue altramuza y la disolución de incubación empleada fue la siguiente: 0,1 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM MES y 1000 μM Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Se emplearon tres disoluciones de lavado distintas compuestas por MES (5 mM), si bien, a una se le añadió 0,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Esteban y col., 2003), a otra 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Esteban y col., 2008) y a la última 20 mM de Na_2EDTA (Weng y col., 2005). Todas las disoluciones se ajustaron a pH 5,5 y el tiempo de lavado fue 15 min ($< 4^\circ\text{C}$). Tiempos similares de lavado/desorción han sido utilizados para estudiar la absorción de Zn, Cd y Hg por otros autores (Lasat y col., 1996; Zhao y col., 2002; Esteban y col., 2008).

Como se puede apreciar en la Fig. 1, no existen diferencias significativas en la tasa de absorción neta de Cu entre las dos disoluciones que contenían $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Mientras que el empleo de 20 mM de Na_2EDTA , redujo de forma significativa la cantidad de Cu absorbida por las raíces. Esto indica que la utilización de Na_2EDTA en el medio de lavado elimina una mayor cantidad del Cu unido al apoplasto de las raíces de altramuza.

1.2. Absorción de Cu en función de la temperatura y de la concentración externa de Cu

La absorción de Cu por las raíces aisladas de plantas de altramuza y soja se ha estudiado en un amplio intervalo de concentraciones de Cu (10-2500 μM). La Fig. 2 muestra la velocidad de absorción de Cu por las raíces de altramuza y soja, en función de la T° y la concentración de Cu en el medio de incubación. En ambas leguminosas, la absorción de Cu está afectada por la T° . Para una y otra (20°C y $< 4^\circ\text{C}$), la velocidad

de absorción de Cu se ajusta a una hipérbola. Sin embargo, una reducción significativa en la absorción de Cu se observa en condiciones de frío, ya que a esta T^a el proceso de absorción metabólica es mínimo (Fig. 2). Por ello, toda la absorción puede ser atribuida a la fracción de Cu que queda retenida en el apoplasto, es decir, en las paredes de las células radiculares, después de la desorción. A 20°C, además se está produciendo una absorción activa, sugiriendo la existencia de un transportador en la raíz, el cual, puede ser utilizado para incorporar el Cu al interior de las células. Al restar los valores de absorción a ambas T^a se obtiene la componente activa. Los datos obtenidos en altramuzy soja se ajustan a una ecuación de Michaelis-Menten (Fig. 3), es decir, a una cinética de saturación, en donde concentraciones ≥ 1000 y $500 \mu\text{M}$ Cu, saturan la absorción del metal por las raíces de altramuzy soja, respectivamente. La planta de altramuzy presenta una K_m de $517,50 \pm 21,81 \mu\text{M}$ y una V_{max} de $3,20 \pm 0,48 \mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$, mientras que los valores de K_m y V_{max} en soja son $97,66 \pm 9,52 \mu\text{M}$ y $1,22 \pm 0,07 \mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$, respectivamente.

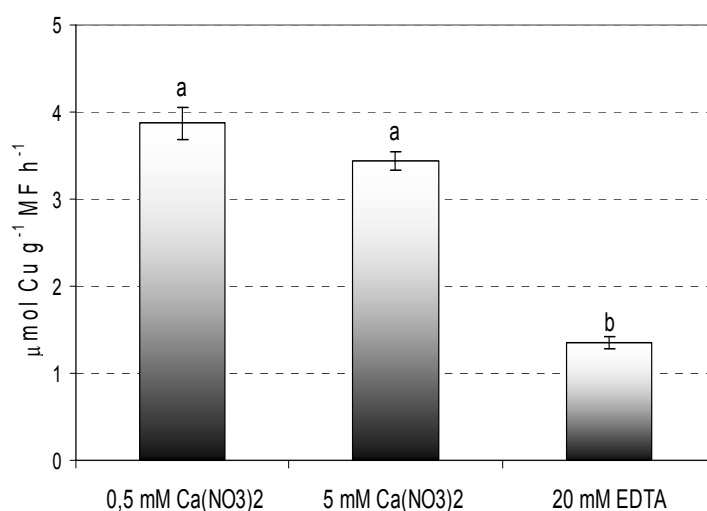


Fig. 1. Velocidad de absorción de Cu por las raíces de altramuzy en función de la disolución de lavado empleada. La incubación se llevó a cabo durante 20 min a 20°C. Encima de las barras se encuentran los resultados del *test* de Duncan ($P < 0,05$)

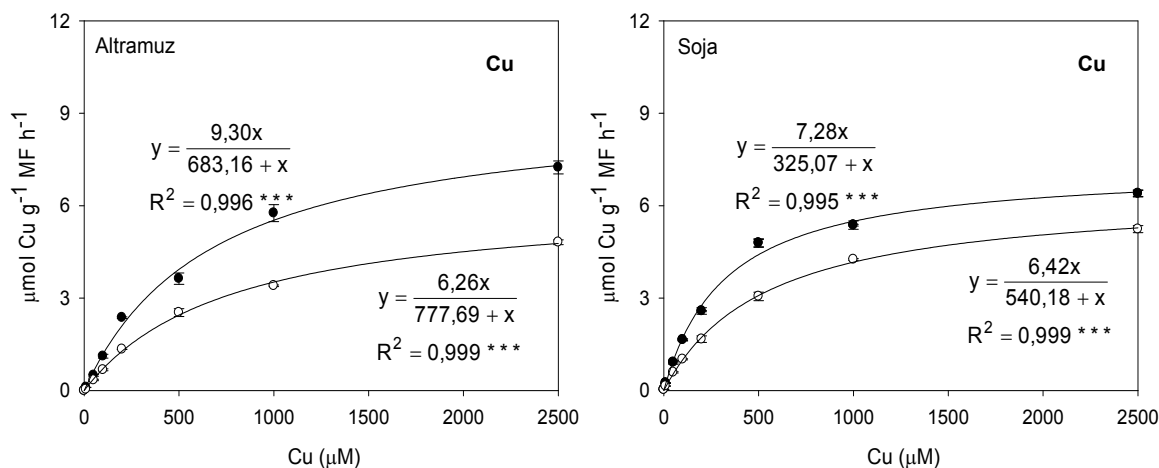


Fig. 2. Absorción de Cu por las raíces de altramuz y soja a diferentes temperaturas: 20°C (●) y frío (< 4°C, ○). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 3$)

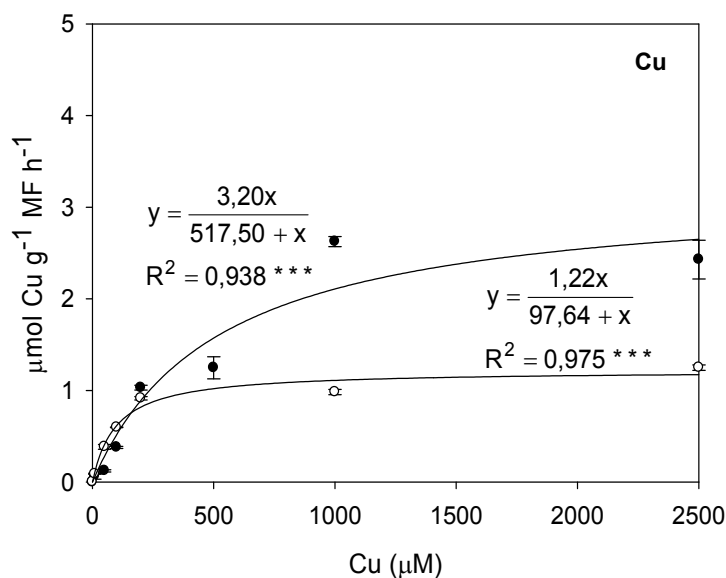


Fig. 3. Componente activa de absorción de Cu en raíces de altramuz (●) y soja (○). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 3$)

1.3. Efecto del Zn sobre la absorción de Cu

Para estudiar el efecto del Zn sobre la tasa de absorción de Cu, a cada medio de incubación con dosis crecientes de Cu (10-2500 μM) se le añadió 100 μM de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). La Fig. 4 muestra la velocidad de absorción de Cu por las raíces de altramuz y soja, en función de la T^a y de la concentración de Cu + Zn en el medio externo. Como en el caso anterior, la absorción de Cu está afectada por la T^a . En

altramuz, la velocidad de absorción de Cu se ajusta a una hipérbola tanto a 20°C como en frío (< 4°C). En soja, los datos obtenidos a < 4°C, se ajustan a una ecuación de Michaelis-Menten, mientras que a 20°C el mejor ajuste es a una hipérbola más una componente lineal. Estos resultados indican que la presencia de Zn parece no afectar a la adsorción de Cu por las paredes celulares de la raíces de ambas leguminosas, mientras que a 20°C la planta de soja absorbe más Cu que la de altramuz. La Fig. 5 muestra el efecto del Zn sobre la absorción activa de Cu. En altramuz, los valores siguen una tendencia hiperbólica, sin embargo en soja, lo hacen a una ecuación de Michaelis-Menten más un ajuste lineal. La componente saturable se observa más claramente a bajas concentraciones de Cu, mientras que, la lineal es más evidente a niveles elevados del metal. Los valores de K_m y V_{max} para altramuz son $412,37 \pm 44,24 \mu M$ y $1,52 \pm 0,18 \mu mol g^{-1} MF h^{-1}$, respectivamente. En soja, la K_m da un valor de $122,75 \pm 24,09 \mu M$ y la V_{max} de $1,21 \pm 0,15 \mu mol g^{-1} MF h^{-1}$. Al comparar estos valores con los obtenidos en la cinética de Cu, se observa cómo en la planta de soja, la presencia de 100 μM de Zn aumenta la absorción activa de Cu, pero reduce a la mitad la de altramuz (Figs. 3 y 5).

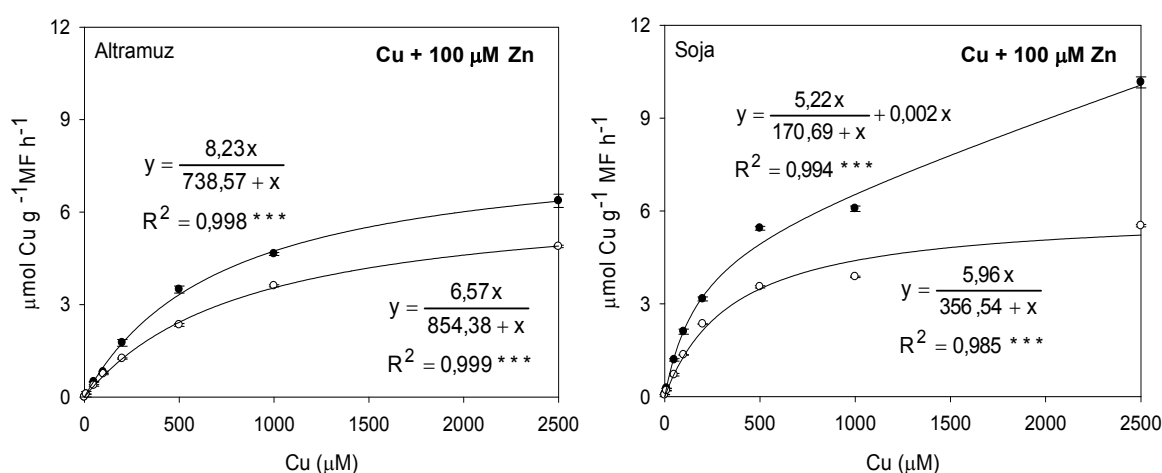


Fig. 4. Absorción de Cu por las raíces de altramuz y soja en presencia de Zn y a diferentes temperaturas: 20°C (●) y frío (< 4°C, ○). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 3$)

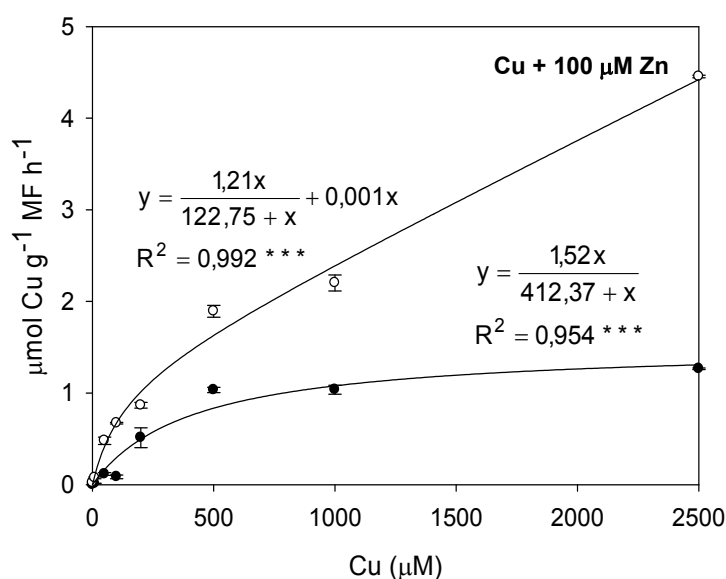


Fig. 5. Efecto del Zn sobre la absorción metabólica de Cu por las raíces de altramuz (●) y soja (○). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 3$)

1.4. Efecto del Mn sobre la absorción de Cu

Para estudiar el efecto del Mn sobre la tasa de absorción de Cu por las raíces de altramuz y soja, a cada medio de incubación con Cu (10-2500 μM) se le añadió 2050 μM de Mn ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). La Fig. 6 muestra la velocidad de absorción de Cu en las dos especies vegetales en función de la T^a y la concentración de Cu + Mn en el medio de incubación. Como en los casos anteriores, la absorción de Cu en presencia de Mn está afectada por la T^a . En altramuz, la velocidad de absorción de Cu se ajusta a una hipérbola tanto a 20°C como en frío ($< 4^\circ\text{C}$). En soja, los valores de absorción a 20°C se ajustan a una hipérbola con una componente lineal, en cambio, a $< 4^\circ\text{C}$ lo hacen a una ecuación de Michaelis-Menten. El aporte de Mn afecta de forma distinta a la adsorción aparente de Cu en ambas leguminosas. Así en altramuz, causa un descenso del Cu adsorbido a la pared celular, mientras que en soja, provoca el efecto contrario, especialmente a niveles elevados de Cu. En cuanto a la componente activa de Cu, en ambas leguminosas los datos se ajustan a una hipérbola más una componente lineal (Fig. 7). En altramuz, los parámetros cinéticos obtenidos son los siguientes: V_{max} $0,80 \pm 0,04 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ y K_m $304,26 \pm 16,90 \mu\text{M}$. En soja, los valores de V_{max} y K_m son $0,24 \pm 0,02 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ y $2,12 \pm 0,18 \mu\text{M}$,

respectivamente. Al igual que en el caso de la cinética Cu + Zn, la componente saturable aparece a bajas concentraciones (0-200 μM Cu), mientras que, la lineal se observa para dosis de Cu > 200 μM en ambas especies vegetales. Por tanto, el aporte de 2050 μM Mn aumenta la absorción activa de Cu, principalmente a concentraciones elevadas del metal. Además, para todo el intervalo de concentración de Cu, la planta de soja presenta una absorción de Cu mayor que la de altramuz.

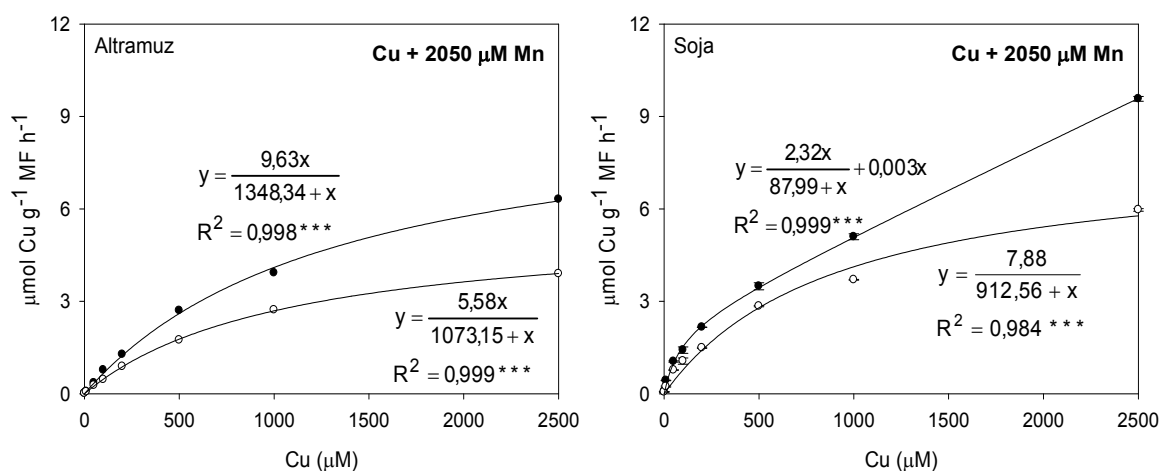


Fig. 6. Absorción de Cu por las raíces de altramuz y soja en presencia de Mn y a diferentes temperaturas: 20°C (●) y frío (< 4°C, ○). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 3$)

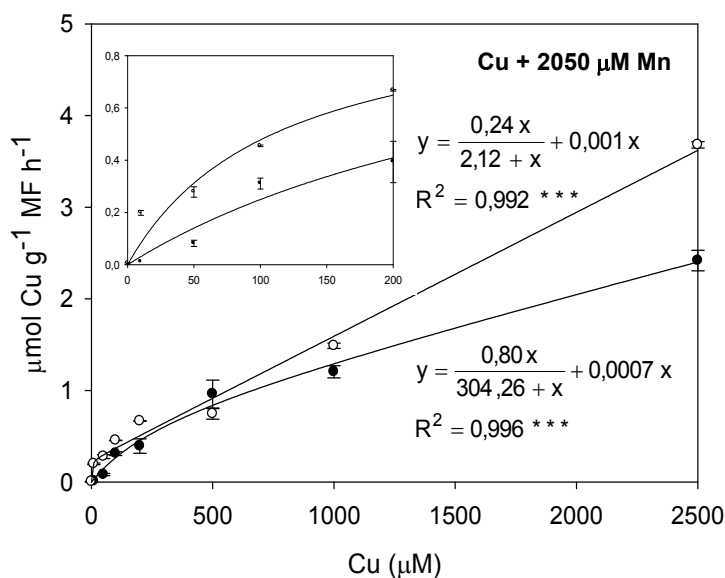


Fig. 7. Efecto del Mn sobre la absorción metabólica de Cu en raíces de altramuz (●) y soja (○). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 3$). Insertado, 0-200 μM Cu

1.5. Efecto del Cd sobre la absorción de Cu

Para estudiar el efecto del Cd sobre la tasa de absorción de Cu por las raíces de altramuiz y soja, a cada medio de incubación con Cu (10-2500 μM) se le añadió 62,5 μM de Cd (CdSO_4). La absorción neta (20°C) y apoplástica (< 4°C) de Cu en raíces de altramuiz y soja se muestra en la Fig. 8. Como los casos anteriores, la absorción de Cu en presencia de Cd, está afectada por la T^a . Además, tanto en altramuiz como en soja, la velocidad de absorción de Cu a 20°C y < 4°C se ajusta a una hipérbola. En comparación con los valores que presenta la planta de soja, se observa que el aporte de Cd a plantas de altramuiz reduce la tasa de absorción neta y apoplástica de Cu. En altramuiz, la componente activa de Cu se ajusta a una ecuación Michaelis-Menten, saturándose a dosis ≥ 500 μM de Cu. Los parámetros cinéticos obtenidos son: V_{max} $1,30 \pm 0,06$ $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ y K_m $232,11 \pm 26,62$ μM . En soja parece seguir un modelo bifásico dependiendo de la concentración externa de Cu; los valores de V_{max} y K_m en esta especie vegetal son respectivamente, $1,75 \pm 0,10$ $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$ y $258,77 \pm 29,41$ μM (Fig. 9). Al comparar estos datos con los obtenidos en la cinética de Cu, se observa que la presencia de Cd (62,5 μM) reduce la absorción activa de Cu en plantas de altramuiz. Por el contrario, en soja la acrecienta; siendo este hecho más acusado a partir de dosis ≥ 500 μM de Cu.

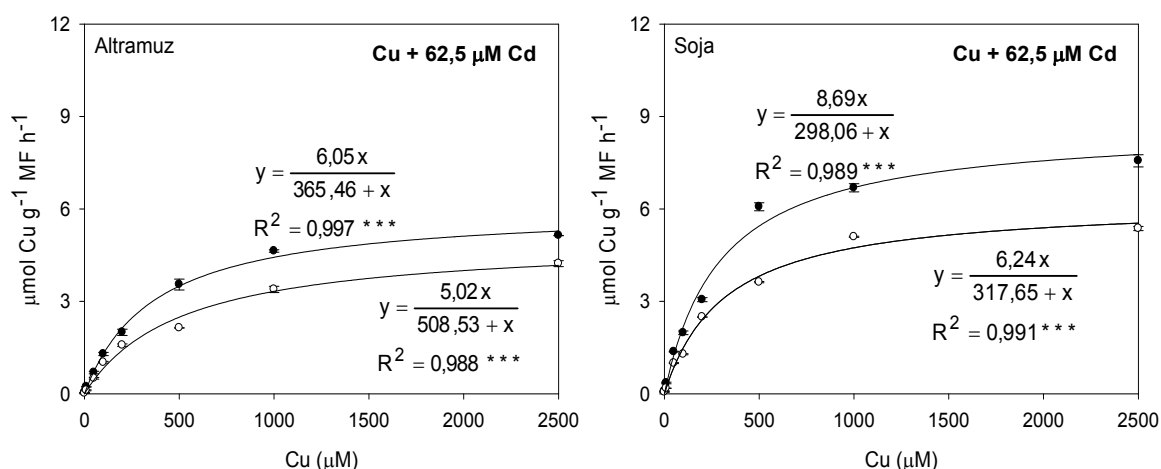


Fig. 8. Absorción de Cu por las raíces de altramuiz y soja en presencia de Cd y a diferentes temperaturas: 20°C (●) y frío (< 4°C, ○). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 3$)

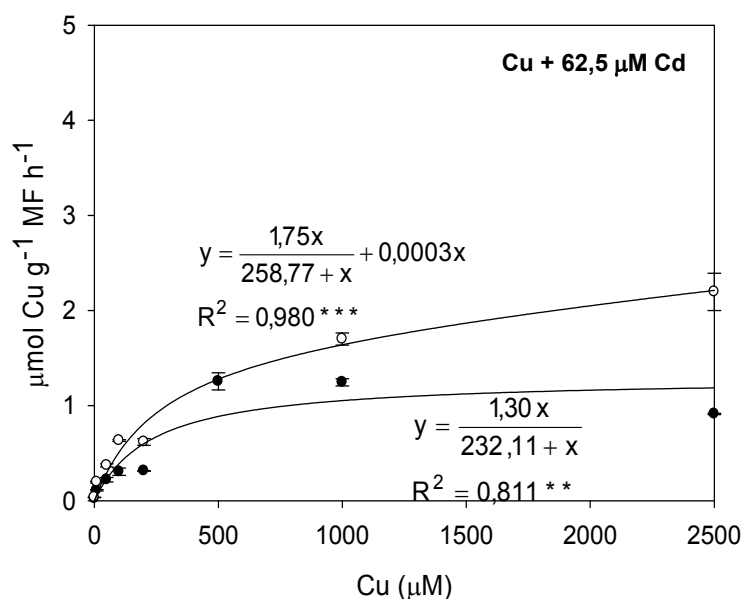


Fig. 9. Efecto del Cd sobre la absorción metabólica de Cu en raíces de altramuz (●) y soja (○). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 3$)

1.6. Efecto del Cu sobre la absorción de Zn, Mn y Cd

En la Fig. 10 aparece representada la velocidad de absorción apoplástica ($< 4^\circ\text{C}$) de Zn, Mn y Cd en función de la dosis de Cu aportada (10-2500 μM). En la planta de altramuz, niveles de Cu $\geq 200 \mu\text{M}$ provocan un descenso de la tasa de adsorción de Zn y Mn, mientras que, para el Cd se observa en todas las dosis de Cu suministradas. En soja, se aprecia una tendencia similar. El efecto de dosis crecientes de Cu (10-2500 μM) sobre la absorción neta (20°C) de Zn, Mn y Cd en raíces de altramuz y soja se muestra en la Fig. 11. En altramuz, la velocidad de absorción de Cd disminuye a medida que aumenta la dosis de Cu en el medio externo, mientras que la de Zn y Mn lo hacen, respectivamente para dosis de Cu > 500 y $1000 \mu\text{M}$. En soja, también se reduce la absorción de Zn, Mn y Cd pero a partir de dosis distintas de Cu (Zn $> 200 \mu\text{M}$; Mn $> 500 \mu\text{M}$ y Cd $> 50 \mu\text{M}$).

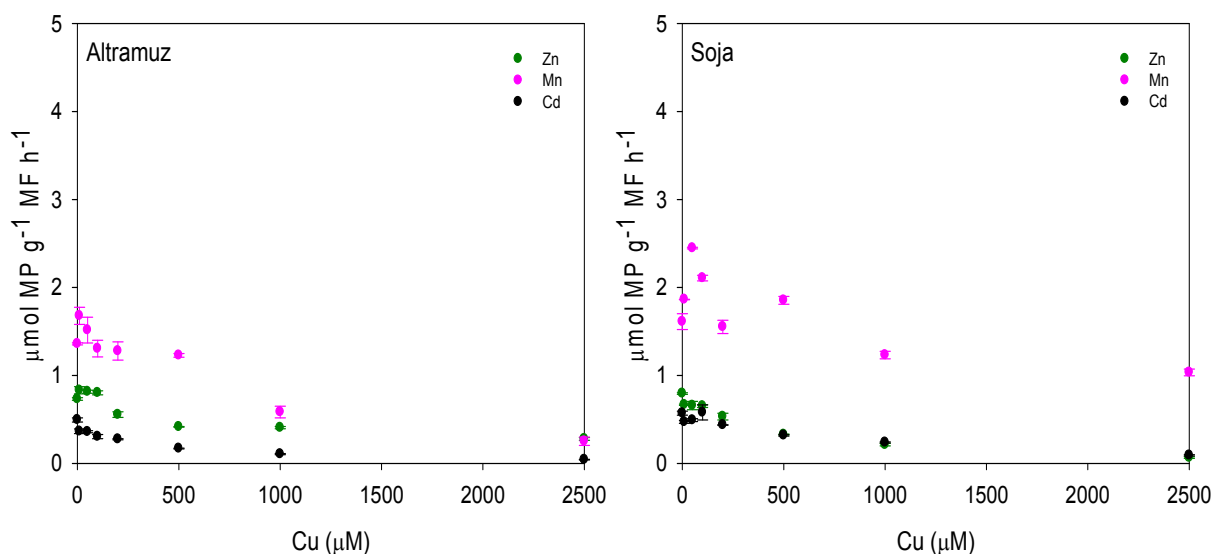


Fig. 10. Efecto de dosis crecientes Cu sobre la absorción apoplástica (< 4°C) de Zn (100 μM), Mn (2050 μM) y Cd (62,5 μM) por raíces de altramus y soja. Las barras verticales indican (±) el E.T. de la media ($n = 3$)

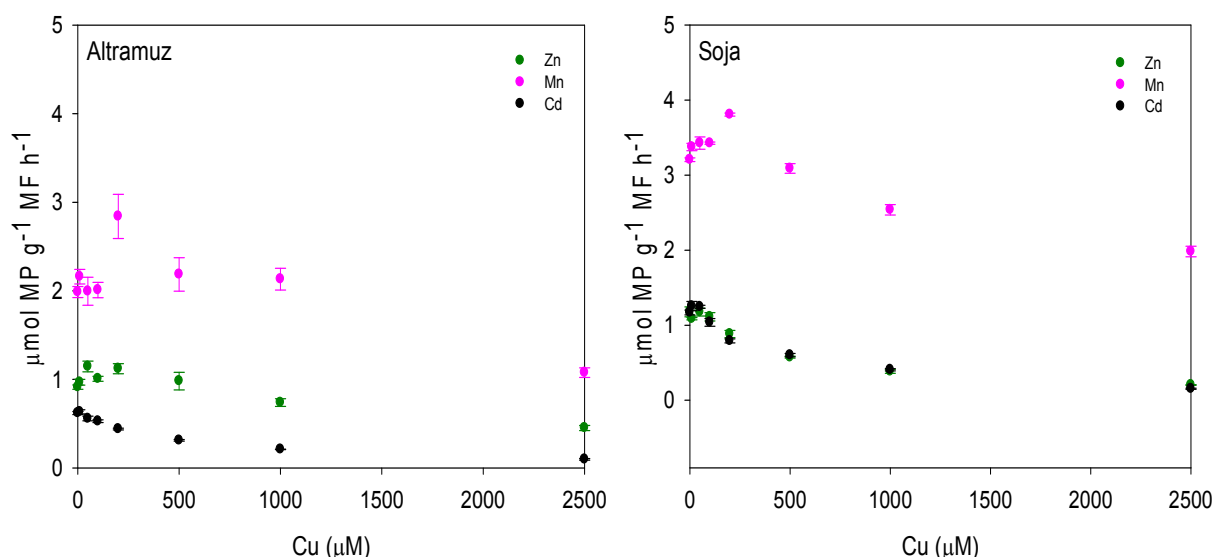


Fig. 11. Efecto de dosis crecientes Cu sobre la absorción neta (20°C) de Zn (100 μM), Mn (2050 μM) y Cd (62,5 μM) por raíces de altramus y soja. Las barras verticales indican (±) el E.T. de la media ($n = 3$)

La absorción metabólica de Zn, Mn y Cd por las raíces de altramus y soja se muestra en la Fig. 12. Dosis elevadas de Cu parecen no afectar a la absorción activa de Zn y Mn en altramus, en cambio, provocan una reducción de la de Cd. En soja, a medida que aumenta la concentración de Cu en el medio externo, disminuye la absorción intracelular de Zn y Cd, pero permanece inalterada la de Mn. Finalmente, con independencia de la dosis de Cu, la planta de soja absorbe más Mn y Cd que la de altramus, aunque muestra una menor capacidad para absorber Zn.

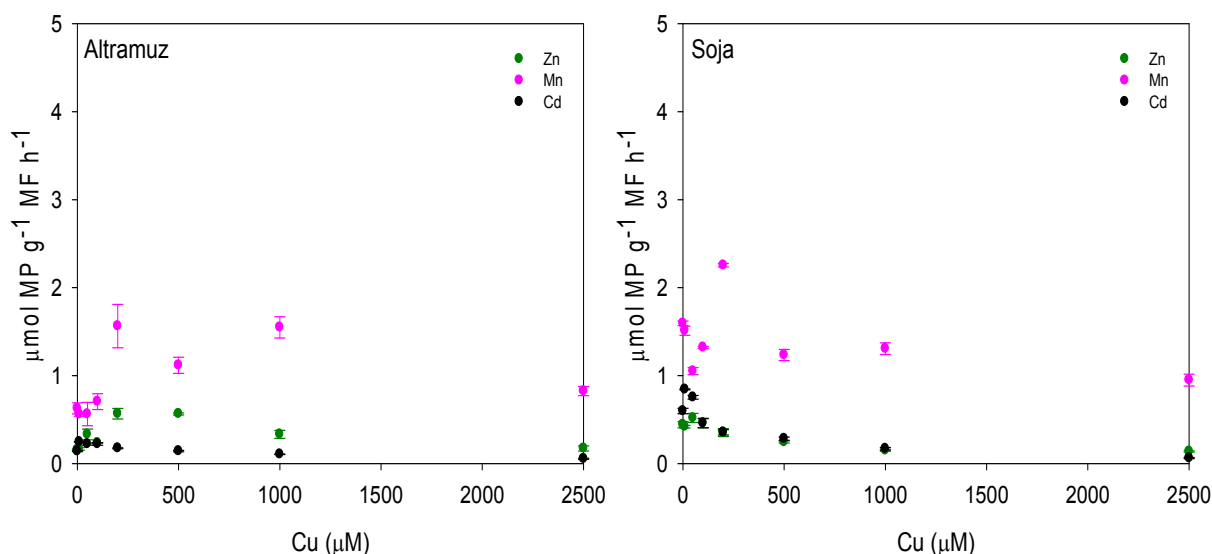


Fig. 12. Efecto de dosis crecientes Cu sobre la absorción metabólica de Zn (100 μM), Mn (2050 μM) y Cd (62,5 μM) por raíces de altramuz y soja. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 3$)

2.- Discusión de cinéticas de absorción de Cu por raíces aisladas de altramuz y soja

La importancia del Cu como nutriente esencial de las plantas, se pone de manifiesto por la existencia de numerosos estudios que han investigado los mecanismos involucrados en su absorción, así como los procesos responsables del transporte a corta distancia y de homeostasis de Cu que regulan las tasas de acumulación, distribución y detoxificación por la plantas (Puig y col., 2007; Burkhead y col., 2009; Bravin y col., 2010). En lo que se refiere al proceso de absorción de Cu, los resultados encontrados en la bibliografía son muy variables. Lo cual se puede atribuir a varias causas, entre las más importantes se encontrarían las motivadas por variaciones en las metodologías experimentales, interacciones iónicas, estado nutricional y edad de las plantas y también a características fisiológicas y morfológicas de las raíces de las especies vegetales y genotipos. Los atributos fisiológicos incluyen la presencia, número y especificidad de los transportadores en las membranas celulares, mientras que los morfológicos serían la longitud, diámetro y densidad de la cabellera radicular (Abedin y col., 2002).

La utilización de plantas intactas para estudios de absorción presenta cierta complejidad, ya que no permite cuantificar de una manera adecuada las constantes cinéticas al estar en funcionamiento procesos de transporte hacia el vástago de la planta ([Cataldo y col., 1983](#)). En este caso, para estimar los parámetros cinéticos de la absorción de Cu se han utilizado raíces aisladas de plántulas de altramuza y soja. La mayoría de los métodos seguidos ya sea con raíces aisladas o con plantas intactas, se suelen usar en estudios a corto plazo, es decir, utilizando tiempos de absorción de Cu < 90 min y la mayoría de las veces, en ausencia de otros iones con los que pueda competir el metal ([Graham, 1981](#)). Sin embargo, en ensayos con raíces aisladas se han observado velocidades de absorción de Cu mayores que cuando se trabaja con plantas intactas ([Babalakova y Traykova, 2001](#); [Antunes y Hale, 2006](#)) y también con tiempos de cultivo más largos ([Bravin y col., 2010](#)). No obstante, bajo condiciones controladas y reproducibles, este tipo de metodologías permiten determinar con cierta fiabilidad, los parámetros cinéticos de absorción del elemento a estudiar y realizar comparaciones entre especies vegetales y genotipos.

En los estudios de absorción de cationes divalentes, una de las mayores dificultades es cómo diferenciar entre la cantidad de elemento unida al apoplasto y la que es incorporada al simplasto. Así, [Cataldo y col. \(1983\)](#) en plantas de soja, encuentran que el Cd ligado a la pared celular incluye una fracción intercambiable y otra no intercambiable, y que la proporción de cada una depende de la concentración externa de Cd. [Costa y Morel \(1993\)](#) con plantas de altramuza tratadas con Cd, estiman que un 25% del metal acumulado en las raíces, está fuertemente retenido por la pared celular, por lo que es muy difícil eliminarlo mediante procesos de lavado suaves. Pero un excesivo proceso de lavado de las raíces puede provocar también la desorción del catión absorbido a través del simplasto. Por lo que eliminar completamente el metal unido a la pared celular, sin ocasionar un flujo de salida del metal absorbido metabólicamente, es prácticamente imposible según comprueban ciertos autores ([Hart y col., 1998](#); [Lombi y col., 2001](#)).

En los ensayos de cinéticas realizados en este trabajo, se ha empleado Na_2EDTA en el medio de lavado y tiempos de desorción/lavado similares a los utilizados por otros autores (Lasat y col., 1996; Lombi y col., 2001; Zhao y col., 2002; Esteban y col., 2008). Según Babalakova y Traykova (2001), la desorción realizada con EDTA, permite establecer una clara distinción entre la absorción llevada a cabo a través del plasmalema y la fracción del elemento que está unida a la pared celular. En este trabajo, la adsorción de Cu por el apoplasto (absorción extracelular) de raíces de altramuz y soja fue estimada indirectamente utilizando una $T^a < 4^\circ\text{C}$ (Fig. 2); ya que en estas condiciones la absorción metabólica es prácticamente nula (Zhao y col., 2002). En *Thlaspi*, las absorciones de Cd y Zn a 2°C alcanzan rápidamente la meseta, sugiriendo una unión apoplástica saturable de estos dos metales a la pared celular de la raíz (Zhao y col., 2002). Algo similar le sucede a la adsorción extracelular de Cu en altramuz y soja, si bien, en esta última leguminosa, se alcanza la saturación a menores dosis de Cu (Fig. 2). En altramuz, la saturación se produce cuando la concentración de Cu en la pared celular es $> 73 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MF}$, mientras que en soja, tiene lugar cuando la concentración es $\geq 59 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MF}$. En ensayos con trigo duro, Bravin y col. (2010) observan la saturación cuando la cantidad de Cu unida al apoplasto es bastante más elevada ($1000 \text{ mg Cu kg}^{-1} \text{ MS}$). A pesar de las diferencias comentadas, parece que las raíces de altramuz y soja presentan la misma capacidad para adsorber Cu, dado que presentan unos valores de V_{max} similares (Fig. 2).

Por otro lado, la absorción neta de Cu (suma de la absorción intra- y extracelular) se ha calculado directamente a 20°C . A bajas concentraciones del metal, las plantas de soja absorben el Cu más rápidamente que las de altramuz. En cambio, a dosis elevadas se observa lo contrario, llegando a la meseta en la planta de soja, a concentraciones más bajas de Cu que en la de altramuz (Fig. 2). En ambas leguminosas, la velocidad de absorción neta sigue una tendencia hiperbólica y aunque la velocidad máxima de absorción de Cu en altramuz es 1,3 veces mayor que en soja, es menor la afinidad por el metal (50%).

La diferencia entre los resultados obtenidos a 20°C y frío (< 4°C) representa la absorción controlada metabólicamente (absorción intracelular), es decir, la llevada a cabo a través del simplasto (Zhao y col., 2002). Análogas aproximaciones también han sido realizadas por otros investigadores (Clemens y col., 1998; Esteban y col., 2003; Esteban y col., 2008). En altramuza y soja, la componente activa de Cu se ajusta a una cinética de saturación de Michaelis-Menten (Fig. 3). Lo que indicaría que sólo un sistema de transporte está operando en todo el intervalo de concentración de Cu utilizado. Resultados similares se han observado en cebada (Veltrup, 1976), arroz y tomate (Bowen, 1987), maíz (Landi y Fagioli, 1983) y trigo (Bravin y col., 2010). Por el contrario, Strange y Macnair (1991) encuentran que la absorción de Cu sigue una tendencia saturable a dosis bajas de Cu y lineal a dosis elevadas del metal. El ajuste a una ecuación de Michaelis-Menten haría referencia a una absorción a través de transportadores, mientras que, el término lineal representaría una difusión pasiva (Strange y Macnair, 1991). En otros trabajos también se observa que la absorción de Cu podría estar formada por un sistema de absorción bifásico, es decir, uno de baja y otro de alta afinidad, basado en una cinética de Michaelis-Menten y un flujo de Cu dependiente de ATP (Lidon y Henriques, 1992; Knauer y col., 1997; Van Hoof y col., 2001). Las familias de transportadores COPT y ZIP están involucradas en la incorporación de Cu al citosol. Según algunos autores (Sancenón y col., 2003; Puig y col., 2007; Yruea, 2009), la absorción de Cu en *Arabidopsis thaliana* podría estar mediada por un transportador de Cu^+ de alta afinidad (COPT1), así como, por el transportador ZIP2 de Cu^{2+} . Asimismo, Bravin y col. (2010) proponen que la absorción activa de Cu en plantas de trigo duro deficientes en Cu, podría ser debida a la intervención de estas dos familias de transportadores. Se ha propuesto que estos transportadores son relativamente promiscuos y lo que hacen es facilitar en situaciones de deficiencia y/o exceso, el transporte de ciertos micronutrientes hacia la estela radicular y que su funcionamiento tendría un papel muy importante en los procesos de homeostasis de iones en los vegetales y, por tanto, en la tolerancia a los metales que exhiben algunas plantas (Guerinot, 2000).

Si se comparan los parámetros cinéticos de absorción activa de Cu entre las dos especies vegetales estudiadas, se observa que los valores de V_{\max} y K_m en altramuz son 2,6 y 5,3 veces mayores, respectivamente, que en soja. Una aproximación de la afinidad del Cu por los transportadores se ha estimado calculando los recíprocos de las K_m . Desde este punto de vista, las raíces de soja (0,0102) parecen tener una afinidad por el Cu, 10 veces superior que las de altramuz (0,0019). Estos resultados podrían indicar una baja afinidad del transportador por el Cu, pero una elevada capacidad de las plantas de altramuz y soja para absorber este metal, ya que se requiere una elevada concentración de Cu para saturar al transportador. Asimismo, los parámetros cinéticos de absorción activa de Cu obtenidos en este estudio, son más altos que los encontrados en otros cultivos como arroz y tomate (Bowen, 1987), berenjena (Burzynski y col., 2005) y cebada (Veltrup, 1976).

Por otro lado, al comparar los parámetros de absorción de Cu extra- e intracelular (Figs. 2 y 3), se observa que el valor de V_{\max} de la absorción apoplásica, es aproximadamente el doble de la simplástica en altramuz y se multiplica por 5 en soja. Esto podría indicar, que el Cu se adsorbe y se localiza principalmente en la pared celular de la raíz de ambas leguminosas. Zhao y col. (2002) estiman que la unión apoplástica del Cd en raíces de *Thlaspi* sp representa aproximadamente un 75% del total absorbido, mientras que para el Zn fue sólo de un 12%. Asimismo, Knauer y col. (1997) observaron que en los primeros momentos de incubación, casi el 90% del Cu presente en el medio externo queda retenido en la pared celular del alga *Scenedesmus subspicatus*.

El conocimiento de los mecanismos involucrados en la absorción de metales es un tema que despierta gran interés en la actualidad, ya que podría conducir a utilizar y desarrollar genotipos más eficaces en estrategias de fitorremediación. La contaminación de un suelo por un único elemento es bastante inusual; en emplazamientos donde hay uno sumamente concentrado, por lo general, existe alguno más. Así, los metales se encuentran, a menudo en el suelo en mezclas de tres a cinco, dependiendo de las fuentes de contaminación. Los efectos ambientales de

estas combinaciones pueden ser bastante diferentes de los que provocaría cada uno de forma individual y ello es debido a interacciones entre ellos ([Kabata-Pendias y Pendias, 2000](#)).

Diversos estudios muestran que la absorción y distribución de Cu se encuentra positiva o negativamente afectada por la presencia y concentración de otros iones en el medio externo ([Weisa y col., 2004](#)). En orégano, un aumento en la concentración externa de Cu exalta el contenido radicular de Cu, Fe y Mn, pero disminuye el de Ca, K y Zn ([Panou-Filotheou y Bosabalidis, 2004](#)). La deficiencia de Fe intensifica la acumulación de Cu en plantas de maíz ([Nenova y Stoyanov, 1999](#)) y guisante ([Cohen y col., 1998](#)), mientras que niveles elevados de Fe, reducen la acumulación de Cu en manzanos ([Vedina y Toma, 2000](#)). Por su parte, [Lin y Wu \(1994\)](#) observan que elevados niveles de Cu en el suelo reducen la absorción de Zn en *Lotus purshianus*; el efecto contrario se ha descrito en plantas de cebada ([Luo y Rimmer 1995](#)). El aporte de Cu ya sea por vía foliar o radicular afecta de forma distinta a la absorción de Fe y Zn en soja ([Bernal y col., 2007](#)). Las deficiencias de Fe o Zn estimulan la absorción de Cu, pero niveles elevados de Cu reducen la acumulación de Fe, Zn y Mn en raíces de la *Commelina communis*, especie caracterizada por ser tolerante al Cu ([Bernal y col., 2007](#)). La presencia de Cd reduce de forma significativa la absorción y transporte de Mn en *Lupinus albus* ([Zornoza y col., 2010](#)).

En este trabajo, se ha estudiado el efecto individual del Zn, Mn y Cd sobre la cinética de absorción de Cu en plantas de altramuz y soja. Se han seleccionado estos metales ya que, en estudios previos, se habían detectado interacciones en la acumulación y distribución de Zn, Mn y Cd en raíces y vástago de plantas de altramuz tratadas con dosis crecientes de Cu ([Sánchez-Pardo, 2007](#)). Las concentraciones de Cd, Zn y Mn utilizadas en los ensayos de interacción se calcularon asignando, respectivamente a cada metal un valor de 1, 1,6 y 32,8 μM . El factor de multiplicación fue 62,5; resultando las siguientes dosis: Cd ($1 \times 62,5 = 62,5 \mu\text{M}$), Zn ($1,6 \times 62,5 = 100 \mu\text{M}$) y para el Mn ($32,8 \times 62,5 = 2050 \mu\text{M}$). Las concentraciones resultantes son, por tanto, 62,5 veces más elevadas que las existentes en la disolución nutritiva control. En

ensayos de cinéticas de absorción a tiempos de incubación cortos, es conveniente suministrar una alta concentración de metales, para poder observar efectos aditivos y/o antagónicos sobre la absorción del elemento a estudiar.

Al estudiar el efecto de 100 μM Zn sobre la absorción intra- y extracelular de Cu, se aprecia que la presencia de Zn no afecta a la velocidad de adsorción de Cu en el apoplasto radicular de altramuz y soja (Fig. 4). En cuanto a la absorción activa (Fig. 5), en altramuz, sigue una cinética de saturación Michaelis-Menten, lo que indicaría que en esta planta, un sólo mecanismo de transporte esté participando en la absorción de Cu en presencia de Zn. En cambio en soja, podrían estar implicados dos mecanismos de absorción, uno activo a bajas concentraciones y otro pasivo a dosis elevadas ($> 1000 \mu\text{M}$ Cu); presentando la planta de soja una mayor tasa de absorción activa de Cu que la de altramuz. Además, parece que elevadas concentraciones de Zn en el medio externo, pudieran causar un efecto antagónico sobre la absorción activa de Cu en la planta de altramuz. Es decir, que el Zn con unas propiedades físico-químicas similares a las del Cu, pudiera unirse a uno o varios transportadores de membranas, e inhibir la absorción de Cu.

En función de cómo varían la V_{max} y la K_m y también la V_{max} y el cociente V_{max} / K_m se puede deducir que tipo de inhibición se estaría produciendo (Tabla 1). Al comparar los parámetros metabólicos obtenidos en la cinética Cu + Zn con los de la cinética de Cu (Tabla 2), se observa en altramuz una reducción significativa de la V_{max} (53%) y del cociente V_{max} / K_m (20%), mientras que las K_m no varían significativamente. Lo cual podría sugerir que la presencia de Zn en el medio de incubación de altramuz produciría una inhibición mixta. Bowen y col. (1987) encontraron que el Zn inhibe de forma competitiva la absorción del Cu en plantas de arroz y tomate, indicando que ambos cationes son absorbidos por el mismo sistema de transporte. Por el contrario, Wu y Antonovics (1975) observaron en un ecotipo tolerante al Zn y al Cu de *Agrostis stolonifera*, que los mecanismos de absorción de ambos metales eran independientes, ya que la absorción de Cu no se veía afectada por la presencia de Zn

y viceversa; en cambio, en los ecotipos no tolerantes, la absorción de Cu disminuía a medida que aumentaba la concentración de Zn en el suelo.

Tabla 1. Influencia del inhibidor en los parámetros cinéticos (V_{\max} , K_m y cociente V_{\max} / K_m).
Adaptado de Lehninger (1995)

Tipo de inhibición	Efecto del inhibidor		
	V_{\max} ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	K_m (μM)	V_{\max} / K_m ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$) / (μM)
Competitiva	—	↑	↓
No competitiva	↓	↓	—
Mixta	↓	—	↓

Por otro lado, en presencia de Mn, la velocidad de absorción de Cu en los sitios activos de la pared celular de las raíces de soja es mayor (1,4 veces) que en altramuza, si bien ambas especies vegetales presentan valores de K_m similares (Fig. 6). En cuanto a la absorción activa de Cu en presencia de Mn (Fig. 7), se observan dos mecanismos: uno activo a bajas concentraciones de Cu y otro pasivo a niveles elevados del metal ($> 200 \mu\text{M}$). La aparición de este último mecanismo podría estar provocado por la peroxidación de lípidos de membrana cuando el nivel de Cu y Mn en el citoplasma es elevado. Como consecuencia de ello, se van a producir cambios en la permeabilidad de la membrana de las células de la raíz, induciendo de esta forma, una difusión pasiva de Cu hacia el simplasto. Ciertos autores (Strange y Macnair, 1991; Burzyński, 2001) han observado que la presencia de niveles elevados de Cu causan la pérdida de integridad de la membrana, y como resultado, se produce una difusión pasiva. Bowen y col. (1987) en arroz y tomate observan que el Mn no afecta a la absorción de Cu ni a la de Zn. Otros autores encuentran que niveles elevados de Mn reducen la tasa de absorción de Cd (Cataldo y Wildung, 1978), Fe y Mg (Shi y col., 2006).

Numerosos estudios ponen de manifiesto desequilibrios en la absorción de agua y nutrientes de las plantas tratadas con Cd (Sanità di Toppi y Grabbrielli, 1999). En este trabajo, el Cd reduce la absorción activa de Cu en altramuza, sin embargo,

produce el efecto contrario en soja (Fig. 9). En altramuz, parece que para todo el intervalo de Cu aplicado, un único mecanismo de absorción estaría actuando ya que los valores se ajustan a una cinética de saturación. Por lo que es probable que la absorción de Cu se esté realizando a través de transportadores de membrana y el tipo de inhibición que se produciría sería no competitiva, ya que disminuyen significativamente la V_{\max} y la K_m y no se modifica el cociente V_{\max}/K_m (Tablas 1 y 2). En soja, el Cd parece ejercer un efecto sinérgico, ya que estimula la capacidad para absorber Cu a través de la membrana. Esto podría estar ocasionado por la existencia de un mecanismo pasivo que funcionaría a niveles elevados de Cu en presencia de Cd. Al igual que se ha observado en los ensayos de interacción Cu-Zn y Cu-Mn, en este caso es la planta de soja la que absorbe una mayor cantidad de Cu. Las interacciones Cd-Cu y Cd-Zn están descritas en la bibliografía, pero con resultados contradictorios en función de la especie vegetal y del grado de tolerancia al metal pesado (Kabata-Pendias y Pendias, 2000).

Tabla 2. Resumen de los parámetros cinéticos de absorción activa de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. Medias en una columna seguidas de la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

	Parámetros cinéticos			
	V_{\max} ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	K_m (μM)	Componente lineal ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	V_{\max}/K_m ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}/\mu\text{M}$)
<i>Altramuz</i>				
Cu	$3,20 \pm 0,48^a$	$517,50 \pm 21,81^a$	----	$0,0062 \pm 0,0002^a$
Cu + Zn	$1,52 \pm 0,18^b$	$412,37 \pm 44,24^a$	----	$0,0037 \pm 0,0004^b$
Cu + Mn	$0,80 \pm 0,04^c$	$304,26 \pm 16,90^b$	$0,0007 \pm 0,0001$	$0,0019 \pm 0,0001^c$
Cu + Cd	$1,30 \pm 0,06^b$	$232,11 \pm 26,62^c$	----	$0,0056 \pm 0,0001^a$
<i>Soja</i>				
Cu	$1,22 \pm 0,07^a$	$97,66 \pm 9,52^a$	----	$0,0125 \pm 0,0002^a$
Cu + Zn	$1,21 \pm 0,15^a$	$122,75 \pm 24,09^a$	$0,0010 \pm 0,0002$	$0,0099 \pm 0,0003^a$
Cu + Mn	$0,24 \pm 0,02^b$	$2,12 \pm 0,18^c$	$0,0010 \pm 0,0001$	$0,1177 \pm 0,0199^b$
Cu + Cd	$1,75 \pm 0,10^a$	$258,77 \pm 29,41^b$	$0,0003 \pm 0,0002$	$0,0067 \pm 0,0010^a$

De los resultados obtenidos en los ensayos de interacción, también se puede evaluar el efecto de dosis crecientes de Cu sobre la absorción de Zn, Mn y Cd (Figs. 10-12). Respecto al Zn, niveles elevados de Cu afectan principalmente a la absorción

apoplástica de Zn en plantas de altramuz. Ambos metales presentan unas propiedades químicas similares, por lo que el Cu podría desplazar al Zn de sus sitios específicos de unión. En soja, además de provocar un descenso de la absorción extracelular de Zn, también inhibe la absorción intracelular. Esto último podría indicar que ambos metales son absorbidos a través del mismo sistema de transporte. [Veltrup \(1978\)](#) encuentra en *Phaseolus vulgaris*, que el Zn y el Cu son absorbidos por mecanismos distintos, ya que la presencia de Cu no inhibe la absorción de Zn, sino que la estimula ligeramente.

En cuanto a la absorción de Mn, niveles elevados de Cu en ambas especies vegetales inhiben la absorción apoplástica de Mn, en cambio, no altera la simplástica, probablemente debido a que ambos son absorbidos mediante distintos transportadores de membranas. [Zornoza y col. \(2010\)](#) al estudiar la interacción Cd-Mn, detectaron que la presencia de Cd en el medio de cultivo reduce la absorción neta de Mn en la planta de altramuz; no detectando un verdadero antagonismo entre ellos. En otras especies, como soja ([Cataldo, 1983](#)), trigo duro ([Hart y col., 1998](#)) y *Phytolacca americana* L. ([Peng y col., 2008](#)) la absorción del Cd y Mn transcurre a través de un sistema de transporte común.

Asimismo en ambas leguminosas estudiadas, el Cu reduce tanto el Cd unido a la pared celular como el absorbido a través de la membrana plasmática. Según [Patra y Sharma \(2000\)](#), el Cd, Hg y Pb pueden ser absorbidos mediante el mismo proceso utilizado por los nutrientes. [Kochian \(1991\)](#) observó que a bajas concentraciones de Cd y Cu, las raíces absorben estos dos metales mediante un sistema de transporte similar. [Cataldo y col. \(1983\)](#) encontraron que el Cu^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} , y posiblemente el Mn^{2+} , inhiben de forma competitiva la absorción de Cd, sugiriendo que estos cationes son absorbidos a través del mismo sistema de transporte. [Zhao y col. \(2002\)](#) proponen que la absorción de Cd en el ecotipo Prayon de *Thlaspi caerulescens* puede ocurrir mediante canales de Ca o transportadores de Zn o Mn, mientras que, en el ecotipo Ganges probablemente tiene lugar a través de un sistema de transporte de membrana altamente selectivo al Cd.



Capítulo II

1.- Resultados de cinéticas de absorción de Cu a medio plazo y respuesta al estrés por Cu en plantas de altramuz y soja

1.1. Cinéticas de acumulación de Cu

Para estudiar la absorción de Cu a medio plazo, las plantas de altramuz y soja se cultivaron con 1,6, 3, 5, 7, 10, 13 y 16 μM de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Las Figs. 1 y 2 muestran, respectivamente, la acumulación de Cu en el vástago y la raíz de ambos cultivos en función de la dosis externa de Cu. En parte aérea, la relación entre dosis de Cu y acumulación se ajusta satisfactoriamente, a una cinética de saturación Michaelis-Menten ($R^2 = 0,96$; $P < 0,001$) en ambas leguminosas. La máxima concentración de Cu presente en el vástago de altramuz es $0,48 \pm 0,03 \text{ nmol Cu g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$ y en el de soja $0,45 \pm 0,04 \text{ nmol Cu g}^{-1} \text{ MS h}^{-1}$. La dosis de Cu requerida para alcanzar la mitad de la concentración máxima en el vástago de altramuz es $1,50 \pm 0,48 \mu\text{M}$ y más del doble en el de soja ($3,61 \pm 1,04 \mu\text{M}$). En las raíces, la acumulación neta de Cu aumenta linealmente con las dosis de Cu utilizadas, tanto en altramuz ($R^2 = 0,92$; $P < 0,001$) como en soja ($R^2 = 0,98$; $P < 0,001$). Además, el coeficiente de regresión lineal en soja es el doble que en altramuz.

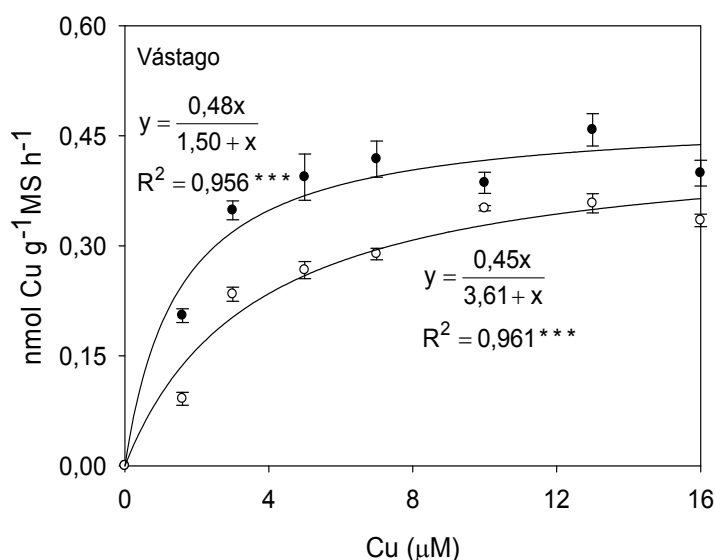


Fig. 1. Acumulación de Cu en el vástago de plantas de altramuz (●) y soja (○) cultivadas durante 35 días con dosis crecientes de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$)

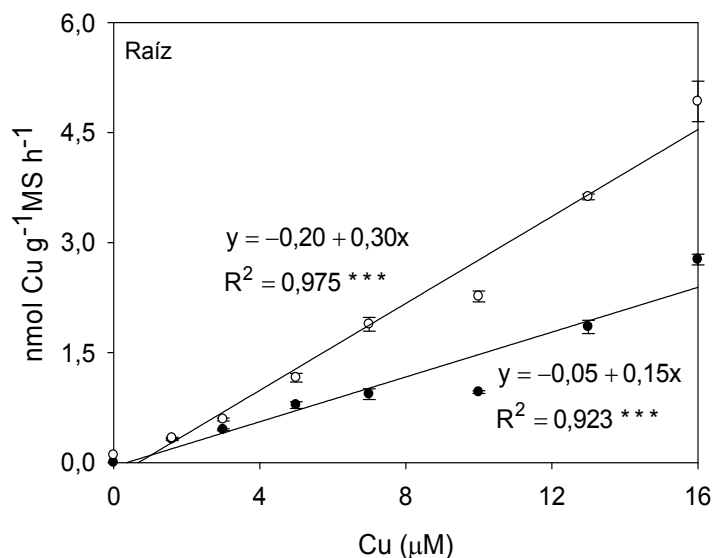


Fig. 2. Acumulación de Cu en las raíces de plantas de altramuz (●) y soja (○) cultivadas durante 35 días con dosis crecientes de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$)

1.2. Síntomas visuales y crecimiento de plantas de altramuz y soja

No se observan síntomas de toxicidad en las plantas de altramuz y soja expuestas a dosis de $\text{Cu} \leq 10 \mu\text{M}$. Sin embargo, ambas especies muestran un acortamiento de tallo y hojas más pequeñas, cuando son tratadas con dosis $> 10 \mu\text{M}$ de Cu. Además en las hojas de las plantas de soja tratadas con la dosis más alta ($16 \mu\text{M}$ Cu), se observan clorosis y necrosis y, en las hojas superiores de altramuz aparecen curvaturas de los bordes hacia en haz de la lámina foliar. En cuanto a la raíz, dosis de $\text{Cu} \leq 16 \mu\text{M}$ parecen no afectar a la longitud de este órgano en altramuz; mientras que en soja, esta dosis de Cu reduce el número y desarrollo de raíces laterales al compararlo con las del tratamiento control. El aspecto de las plantas de altramuz y soja del tratamiento control ($1,6 \mu\text{M}$ Cu) y las cultivadas con las dosis más alta de Cu ($16 \mu\text{M}$) se muestra en la Fig. 3. Los resultados de biomasa, estimados como pesos frescos del vástago y raíces de plantas de altramuz y soja, sometidas a dosis crecientes de Cu ($1,6$ - $16 \mu\text{M}$), se muestran en la Fig. 4. Al comparar con el tratamiento control ($1,6 \mu\text{M}$ Cu), no se observan variaciones significativas en el peso fresco de las raíces de altramuz, sin embargo, la dosis más alta de Cu promueve una disminución significativa del peso del vástago. En soja, sólo con la dosis $16 \mu\text{M}$ de Cu

se detecta una reducción significativa el peso de la parte aérea y subterránea de la planta.

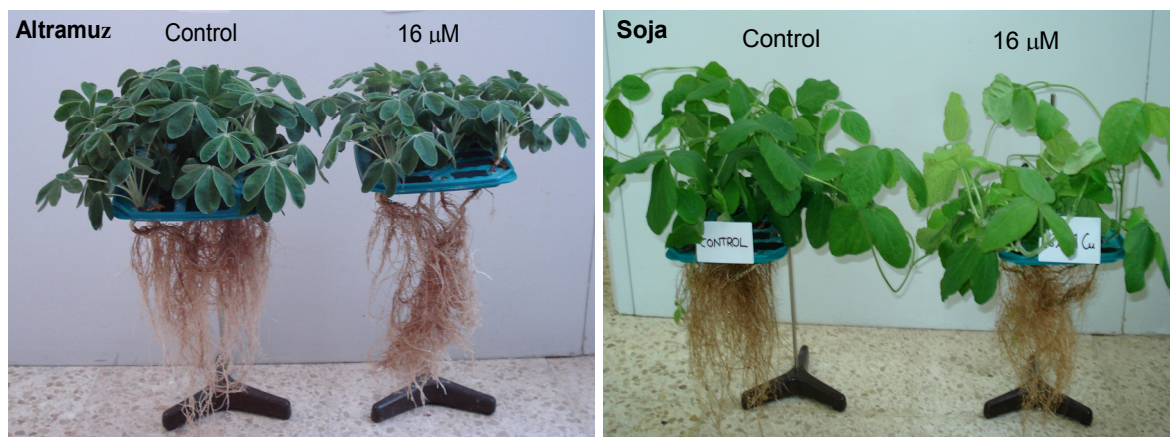


Fig. 3. Aspecto de las plantas de altramuz y soja cultivadas durante 35 días con 1,6 μM Cu (control) y 16 μM Cu

1.3. Indicadores de estrés

Los valores medios de MDA, -SH, polifenoles, antocianinas y flavonoides en hojas y raíces de plantas de altramuz y soja, procedentes de las dosis 1,6, 7, 13 y 16 μM de Cu se recogen en la [Tabla 1](#). En altramuz, la producción de MDA en las hojas es significativamente más alta en las plantas crecidas con 7, 13 y 16 μM de Cu que en las control; sin embargo, no se observan diferencias entre estos tratamientos. En las raíces, la producción de MDA aumenta significativamente al aportar las dos dosis de Cu más altas, en cambio, no se aprecian diferencias entre las raíces control (1,6 μM) y las tratadas con 7 μM Cu. En las hojas de altramuz, la cantidad de -SH totales sólo aumenta en las hojas (14%) y disminuye en las raíces (22%) de las plantas cultivadas con 16 μM de Cu; entre el resto de dosis no se aprecian diferencias significativas en ninguno de los dos órganos analizados. La concentración de polifenoles totales en raíz permanece inalterada por efecto de las dosis de Cu. Los flavonoides totales aumentan en las raíces de altramuz expuestas a 16 μM de Cu (27%) en comparación al tratamiento control. Este último y las dosis 7 y 10 μM de Cu no muestran variaciones.

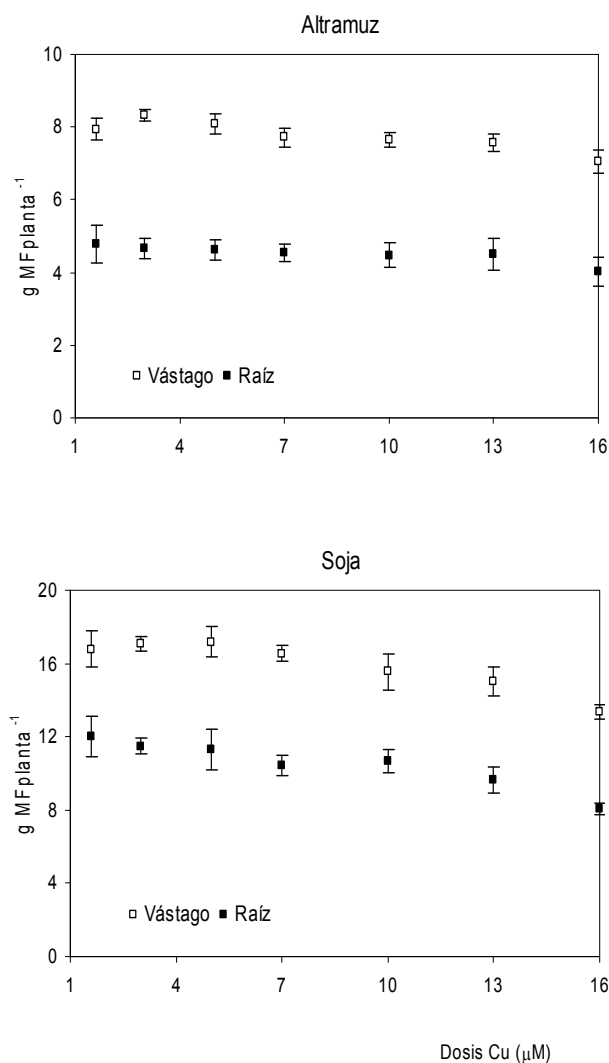


Fig. 4. Peso fresco del vástago (□) y raíz (■) de plantas de altramus y soja sometidas durante 35 días a dosis crecientes de Cu (1,6-16 µM). Los resultados son las medias (±) E.T. ($n = 4$)

En las raíces de soja, la producción de MDA no varía con la exposición a dosis crecientes de Cu, pero aumenta de forma significativa en las hojas de las plantas tratadas con 16 µM de Cu (14%). En comparación a los valores del control, los niveles de -SH en las hojas de soja, se incrementan con la dosis de Cu, mientras que, disminuyen de forma significativa en las raíces de las plantas crecidas con dosis ≥ 7 µM de Cu. La concentración de polifenoles totales es significativamente menor, respecto a los valores del control, en las raíces de soja expuestas tanto a 13 µM de Cu (9%), como a 16 µM de Cu (11%). Por el contrario, no se observan diferencias significativas entre los valores obtenidos para dosis más bajas (1,6 y 7 µM Cu). Los flavonoides totales no varían en el intervalo de 1,6-13 µM de Cu; después decrecen

significativamente, aunque las raíces de soja crecidas en 13 y 16 de μM Cu presentan valores similares (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la dosis de Cu sobre la concentración de MDA (nmol g^{-1} MF), -SH (nmol SH g^{-1} MF), polifenoles totales (mg g^{-1} MS) y flavonoides totales (Ab g^{-1} MS) en hojas y raíces de altramuz y soja, tras 35 días de tratamiento. Los datos son las medias (\pm) E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo con el test de Duncan ($P < 0,05$)

		Dosis de Cu (μM)			
		1,6	7	13	16
		<i>Altramuz</i>			
Hojas	MDA	21,44 \pm 0,14 ^a	30,64 \pm 1,46 ^b	29,33 \pm 0,50 ^b	29,45 \pm 0,49 ^b
	-SH	561,26 \pm 20,01 ^a	548,55 \pm 15,36 ^a	535,13 \pm 14,98 ^a	640,68 \pm 5,06 ^b
Raíz	MDA	32,15 \pm 1,31 ^a	35,12 \pm 0,89 ^a	46,66 \pm 0,63 ^b	51,10 \pm 0,40 ^c
	-SH	146,30 \pm 2,71 ^a	140,97 \pm 4,54 ^a	135,49 \pm 2,16 ^a	114,13 \pm 4,69 ^b
	Polifenoles totales	12,45 \pm 0,26 ^a	11,96 \pm 0,60 ^a	12,42 \pm 0,78 ^a	13,41 \pm 0,60 ^a
	Flavonoides totales	33,19 \pm 1,39 ^a	30,80 \pm 2,87 ^a	32,90 \pm 2,15 ^a	42,28 \pm 3,14 ^b
		<i>Soja</i>			
Hojas	MDA	35,83 \pm 0,27 ^a	33,98 \pm 0,44 ^a	31,71 \pm 0,52 ^a	40,98 \pm 0,92 ^b
	-SH	694,71 \pm 5,13 ^a	753,32 \pm 8,60 ^b	735,47 \pm 9,69 ^b	794,40 \pm 10,51 ^c
Raíz	MDA	35,14 \pm 0,29 ^a	35,20 \pm 1,12 ^a	31,77 \pm 0,83 ^a	34,21 \pm 0,91 ^a
	-SH	375,69 \pm 12,79 ^a	282,24 \pm 9,25 ^b	287,62 \pm 5,61 ^b	300,08 \pm 3,87 ^b
	Polifenoles totales	8,23 \pm 0,22 ^a	8,50 \pm 0,17 ^a	7,46 \pm 0,25 ^b	7,29 \pm 0,23 ^b
	Flavonoides totales	23,08 \pm 0,82 ^a	22,45 \pm 0,70 ^a	21,20 \pm 0,92 ^{ab}	19,71 \pm 0,59 ^b

2.- Discusión de cinéticas de absorción de Cu a medio plazo y respuesta al estrés por Cu en plantas de altramuz y soja

En la mayoría de los casos, el estudio de las cinéticas de absorción de nutrientes se lleva a cabo utilizando periodos de absorción cortos. Sin embargo, para tener una visión mas completa del proceso, es conveniente considerar tiempos de exposición más largos, para poder incluir otras variables en los mecanismos de regulación homeostática de los que disponen las plantas. Entre las variables se encuentran el estado nutricional de la planta (Reid y Liu, 2004) y la adaptación fisiológica a las condiciones de cultivo (Bravin y col., 2010).

Asimismo, la absorción de Cu a medio y largo plazo puede estar influenciada por otros factores como son la compartimentación en las raíces, la translocación y uso en la parte aérea de la planta. Se ha observado que al someter a las plantas durante un tiempo prolongado a un contaminante o bien a un nivel elevado de un nutriente se producen alteraciones morfológicas y fisiológicas en ellas (Prasad, 2004). El exceso de Cu puede provocar cambios en la estructura de la raíz, lo cual puede afectar a las cinéticas de absorción y ser el responsable de alteraciones en el metabolismo del vegetal (Bravin y col., 2010; Lequeux y col., 2010). En *Vigna unguiculata*, el Cu provoca rupturas en la rizodermis después de 12 h de exposición a 1,1 μM de Cu^{2+} (Kopitte y col., 2008). Por ende, deben realizarse experimentos a medio y largo plazo para conocer con mayor exactitud donde acumula el MP y cómo afecta al metabolismo vegetal y por lo tanto, al crecimiento.

En este trabajo se han estudiado las cinéticas de acumulación de Cu en plantas de altramuza y soja después de haber estado sometidas durante 35 días a dosis crecientes de Cu (1,6-16 μM). La cantidad de Cu acumulado tanto en la parte aérea como en las raíces de altramuza y soja, aumenta según lo hace la dosis aportada, aunque la relación matemática entre ambas variables, difiere considerablemente según se considere uno u otro órgano vegetal (Figs. 1 y 2). En ambas especies, la pauta de acumulación en el vástago se ajusta a una cinética de saturación similar a la obtenida en los experimentos a corto plazo. En raíz, dosis y acumulación de Cu siguen una tendencia lineal. Dado que no se ha observado una cinética de saturación en este órgano vegetal, los resultados obtenidos podrían indicar que para el intervalo de Cu utilizado (1,6-16 μM), las raíces de ambas especies continúan acumulando Cu, y probablemente serían necesarias dosis mayores del metal para observar la saturación. En otros experimentos con altramuza, se detecta que la pauta de acumulación de Hg en la parte aérea y subterránea muestra una tendencia a la saturación para dosis de Hg < 5 μM , pero lineal para dosis más altas (Esteban y col., 2008). Por su parte, Vázquez y col. (2006) encuentran que una acumulación hiperbólica de Cd en raíces de altramuza, mientras que en el vástago, la relación entre dosis de Cd y concentración se ajusta a una regresión lineal.

Comparado con otros metales, el Cu muestra baja movilidad entre los distintos órganos vegetales, acumulándose mayoritariamente en la raíz ([Kabata-Pendias y Pendias, 2000](#)). En el sistema radicular, el Cu se une principalmente a los grupos carboxílicos de las pectinas y ácidos poligalacturónicos, así como, al N de proteínas y enzimas de la pared celular ([Marschner, 1995](#)). En este caso, ambas leguminosas acumulan mayoritariamente el Cu en la raíz; solamente una pequeña fracción es transportada a la parte aérea. Para el intervalo de dosis aplicadas, la concentración de Cu en las raíces de altramuza y soja aumenta desde aproximadamente 10 mg kg^{-1} MS para la dosis más baja, hasta 92 mg kg^{-1} MS y 171 mg kg^{-1} MS, respectivamente para las tratadas con las dosis más alta ($16 \mu\text{M Cu}$). Sin embargo, la concentración de Cu encontrada en la parte aérea de altramuza dobla a la de soja, aumentando en la primera desde $8,7 \text{ mg kg}^{-1}$ MS a $22,7 \text{ mg kg}^{-1}$ MS y en la segunda desde $4,3 \text{ mg kg}^{-1}$ MS a $13,8 \text{ mg kg}^{-1}$ MS. De los resultados anteriores se podría deducir que las raíces de soja muestran una mayor capacidad que las de altramuza para retener Cu, pero un menor potencial para transportar el MP hacia la parte aérea de la planta.

A pesar de la amplia tolerancia de las especies vegetales y genotipos al exceso de Cu, este metal es altamente tóxico. La toxicidad afecta a numerosos procesos en las plantas, como son la fotosíntesis y la biosíntesis de pigmentos, el metabolismo de las proteínas, la integridad de las membranas, la absorción de nutrientes y todo ello causa una reducción del crecimiento y, a veces, la muerte del vegetal ([Fernandes y Henriques, 1991](#); [Ouzounidou y col., 1995](#)).

La reducción del crecimiento y del desarrollo de raíces laterales son síntomas habituales que presentan las plantas tratadas con niveles elevados de Cu ([Maksymiec, 1997](#)). Sin embargo, el grado de inhibición del crecimiento, es estrictamente dependiente del vegetal y de la dosis suministrada. En muchas especies sensibles, el crecimiento se inhibe cuando la concentración en las hojas está comprendida entre 15 y 20 mg Cu kg^{-1} MS. Pero para la mayoría de las plantas, los síntomas de toxicidad aparecen con concentraciones foliares $>$ de 30 mg Cu kg^{-1} MS ([Robson y Reuter, 1981](#)). Algunos cereales como el trigo ([Lanaras y col., 1993](#)), arroz ([Lidon y col., 1993](#)),

avena (Moustakas y col., 1994) y cebada (Vassilev y col., 2002) son relativamente tolerantes al exceso de Cu. Otras especies vegetales se muestran más sensibles al exceso de Cu; tal es el caso de altramuz (Jung y col., 2003), orégano (Panou-Filotheou y col., 2001) y soja (Bernal y col., 2007).

La dosis de Cu aportada es un factor importante a la hora de evaluar una situación de estrés; en este sentido el suministro de 20 μM de Cu a *Minuartia hirsuta* inhibe el crecimiento radicular en torno al 50% (Ouzounidou y col., 1994), mientras que en tomate se produce al aplicar tan sólo 4 μM Cu (Jung y col., 2003). Por su parte, Jung y col. (2003) no encontraron variaciones en la producción de biomasa en el vástago o la raíz de plantas de *Lupinus albus* cultivadas con 20 μM de Cu; sin embargo, el suministro de 62 μM de Cu redujo enormemente (70%) el peso de las plantas. En este estudio, el crecimiento y desarrollo de las raíces de la planta de soja y el de las hojas de altramuz, son los órganos más negativamente afectados por el aporte de dosis de 16 μM de Cu. Dosis inferiores no afectan significativamente al crecimiento de las dos leguminosas (Fig. 4).

Por otro lado, el exceso de Cu genera estrés oxidativo al inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (Schützendübel y Polle, 2002). En las células, el Cu^{2+} es fácilmente reducido a Cu^+ . Esta forma es inestable y tiende a ser oxidada dando lugar a la reacción de Fenton, y por consiguiente, a la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden causar la peroxidación de lípidos (Cuypers y col., 2000; Navari-Izzo y col., 2001). El MDA es un indicador de la peroxidación de lípidos y por lo tanto, de estrés oxidativo. En este trabajo, el aporte de dosis de $\text{Cu} \geq 7 \mu\text{M}$ produce un incremento de la concentración de MDA de hojas de altramuz, mientras que sólo la dosis más alta de Cu promueve este efecto en las de soja. La peroxidación de lípidos también aparece en las raíces de altramuz cuando son cultivadas con niveles de $\text{Cu} \geq 13 \mu\text{M}$, sin embargo, no se observa en las raíces de soja para ninguna dosis de Cu (Tabla 1). En la planta de altramuz, el Cu estimula la producción de MDA en los tejidos, indicando la aparición de estrés oxidativo. Entre los daños que puede causar la peroxidación de lípidos se encuentra la alteración de

las propiedades de las membranas celulares, lo que afecta notablemente a la absorción y distribución de nutrientes (Hall, 2002). Cuando la capacidad de detoxificación de los sistemas antioxidantes naturales no puede mantener el ritmo de producción de las ROS aparecen los daños en los tejidos vegetales. Los antioxidantes son moléculas que inhiben o ralentizan la oxidación de otras moléculas, parando de esta manera la propagación en cadena de las reacciones oxidativas (Navari-Izzo y col., 2001).

Los tioles (-SH) juegan un papel muy importante como mecanismo de defensa en la detoxificación citoplasmática de los metales pesados, y además son requeridos para contrarrestar el efecto perjudicial del estrés oxidativo (Noctor y Foller, 1998). Asimismo, los compuestos fenólicos proceden del metabolismo secundario que protegen a los tejidos de las plantas frente al estrés oxidativo, debido a su capacidad antioxidante. Su acumulación en las plantas es estimulada por varios estreses bióticos y abióticos (Dixon y Paiva, 1995). Al ser agentes reductores, eliminan o reducen los productos de desecho del metabolismo, pero también pueden formar quelatos con los metales pesados. En particular, los grupos carboxilos e hidroxilos pueden unirse fuertemente al Cu^{2+} y Fe^{2+} , y así, reducir la concentración libre del contaminante en las células de las plantas (Fernández y col., 2002). La inducción de la ruta del shikimato, la acumulación de compuestos fenólicos solubles y el aumento en el contenido de lignina se ha observado en plantas de pepino (Díaz y col., 2001), altramuz (Jung y col., 2003) y soja (Lidon y col., 1993) tratadas con niveles elevados de Cu. Pero también se ha detectado una reducción de tioles en plantas de maíz cultivadas con un exceso de Cu (Nocito y col., 2006).

En este estudio, la exposición de las plantas de altramuz a 16 μM Cu, estimula la producción -SH en las hojas y de flavonoides en raíz. Como en las raíces de soja no se detectaron variaciones en la producción de MDA, esto indicaría la ausencia de estrés oxidativo; sin embargo, en las hojas se incrementa la producción de MDA, y como consecuencia de ello, podría haberse desencadenado una respuesta antioxidante en la planta (Tabla 1).



Capítulo III

1.- Resultados de ecotoxicidad y bioacumulación de Cu en plantas de altramuz y soja

1.1. Absorción neta, acumulación y transporte de Cu

Los resultados de absorción neta de Cu en plantas de altramuz y soja cultivadas con 1,6, 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128 y 144 μM de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) se muestran en la [Fig. 1](#). Este índice se ha calculado como el cociente entre el contenido total de Cu en planta y los días de tratamiento ([Zornoza y col., 2002](#)). Según aumenta de dosis de Cu, la absorción neta del MP muestra una relación lineal tanto en altramuz ($R^2 = 0,954^{***}$; $P < 0,001$) como en soja ($R^2 = 0,977^{***}$; $P < 0,001$). Aunque el coeficiente de regresión en soja es 1,7 veces más alto del que se obtiene en altramuz. Si se comparan los valores del tratamiento control (1,6 μM) y los del tratamiento 32 μM en altramuz, la cantidad de Cu absorbido se multiplica por 13 y las diferencias se acrecientan al hacerlo las dosis suministradas; absorbiendo $0,76 \pm 0,04 \mu\text{mol Cu planta}^{-1} \text{ día}^{-1}$ al tratar la planta de altramuz con la dosis más alta. En soja, si se comparan los valores de absorción neta del tratamiento control (1,6 μM) y los del tratamiento 32 μM de Cu, se observa que la tasa de absorción neta aumenta 10 veces, y de esta dosis en adelante, se exalta de forma casi proporcional con la concentración de Cu suministrada, alcanzando valores de $1,46 \pm 0,11 \mu\text{mol Cu planta}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en las cultivadas con la dosis más alta (144 μM Cu).

La concentración de Cu en el vástago y la raíz de plantas de altramuz y soja tratadas con dosis crecientes de Cu, se muestra en las [Figs. 2 y 3](#), respectivamente. En general, el Cu en planta aumenta a medida que lo hace la dosis del metal en el medio de cultivo. En el vástago de altramuz, la concentración de Cu sigue una tendencia hiperbólica hasta 112 μM Cu, mientras que en soja esto se observa hasta 128 μM Cu. A partir de estas dosis, la acumulación de Cu en vástago se dispara en ambos cultivos, aunque en altramuz la concentración de Cu no varía al pasar de 128 a 144 μM de Cu.

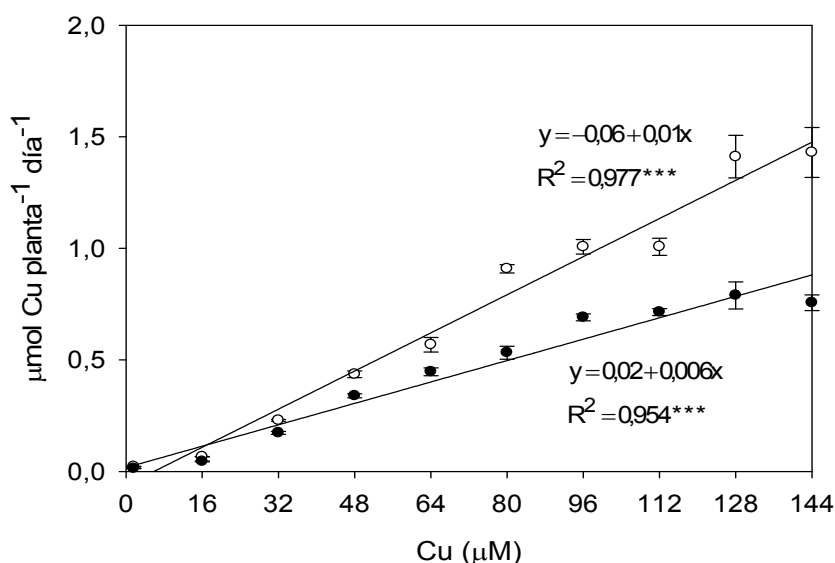


Fig. 1. Absorción neta de Cu en plantas de altramuz (●) y soja (○) cultivadas durante 14 días con dosis crecientes de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$)

Por otro lado, si se comparan ambos cultivos, hasta 64 μM Cu no se observan variaciones en la tasa de acumulación de Cu en el vástago, pero a partir de esta dosis se detectan grandes diferencias entre ellas (Fig. 2). En este sentido, los vástagos de las plantas de altramuz y soja cultivadas con 1,6 μM de Cu, acumulan en parte aérea $11,84 \pm 0,32$ y $8,62 \pm 0,55$ mg Cu kg^{-1} MS, respectivamente; mientras que los de las tratadas con la dosis más alta (144 μM), dan valores de $145,19 \pm 12,15$ mg Cu kg^{-1} MS en altramuz y de aproximadamente el doble en soja ($293,66 \pm 4,47$ mg Cu kg^{-1} MS).

En raíz, la relación entre concentración y dosis de Cu aportada sigue una tendencia hiperbólica ($R^2 = 0,971***$; $P < 0,001$) en altramuz, en cambio, en soja muestra una relación lineal ($R^2 = 0,915***$; $P < 0,001$). Como sucede en parte aérea, las diferencias entre las especies vegetales son poco significativas hasta 64 μM Cu, pero a partir de esa dosis se acrecientan. La concentración de Cu hallada en las raíces de las plantas del tratamiento control (1,6 μM Cu) es $19,42 \pm 0,65$ mg Cu kg^{-1} MS en altramuz y $39,17 \pm 3,28$ mg Cu kg^{-1} MS en soja. En las raíces procedentes de la dosis más alta (144 μM Cu) se alcanzan valores de $4257,84 \pm 86,49$ mg Cu kg^{-1} MS en altramuz y de $10661,16 \pm 136,26$ mg Cu kg^{-1} MS en soja (Fig. 3).

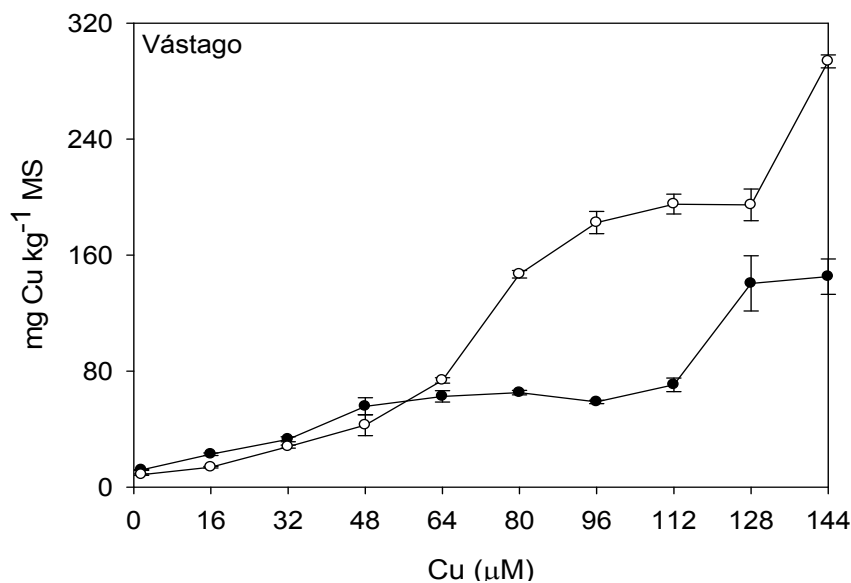


Fig. 2. Concentración de Cu en el vástago de plantas de altramu (●) y soja (○) tratadas con dosis crecientes de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$)

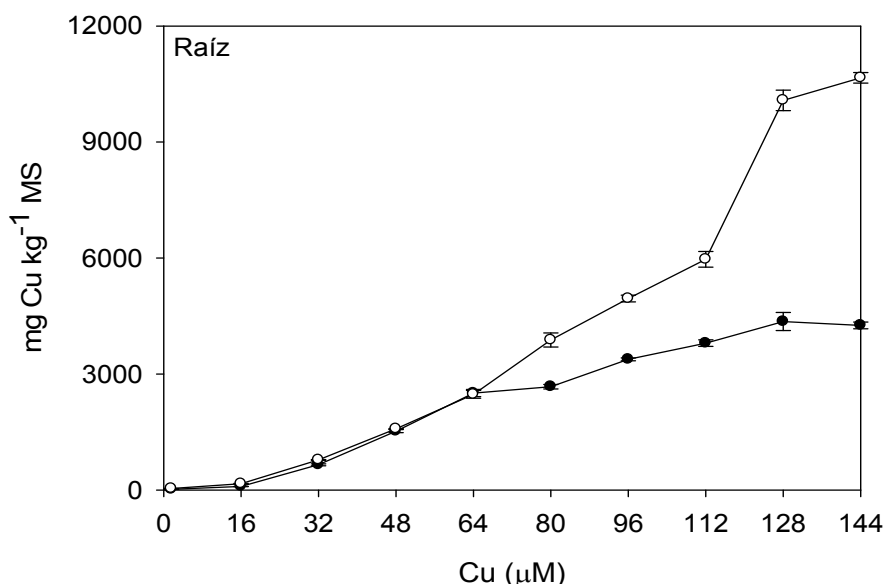


Fig. 3. Concentración de Cu en las raíces de plantas de altramu (●) y soja (○) tratadas con dosis crecientes de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$)

Por otra parte, se ha estimado el factor de bioacumulación (BAF) de Cu en vástago y raíz, calculado como el cociente entre el contenido del MP en cada órgano y la cantidad de Cu suministrada a la planta (An y col., 2004; Cao y col., 2007a). La Fig. 4 muestra para cada leguminosa, la relación entre el $BAF_{\text{vástago}}$ y el $BAF_{\text{raíz}}$ en función de la dosis de Cu aplicada. Este factor permite evaluar variaciones en la tasa de

translocación del MP en función de la dosis y de las características intrínsecas del vegetal. En altramuza cuando es sometido al tratamiento control, esta relación es > 1 , lo cual indicaría que el Cu se acumula principalmente en la parte aérea del vegetal. La planta de soja, en estas mismas condiciones de cultivo, da un valor 0,75, lo que sugiere, en este caso, una menor acumulación del Cu en el vástago y una exaltación en la acumulación radicular. El aporte de $16 \mu\text{M}$ Cu disminuye el valor inicial hasta casi la mitad en altramuza y a un quinto en soja. Dosis de $\text{Cu} \geq 32 \mu\text{M}$ reducen el cociente en un 90% aproximadamente, no encontrando después casi diferencias entre las dos leguminosas estudiadas.

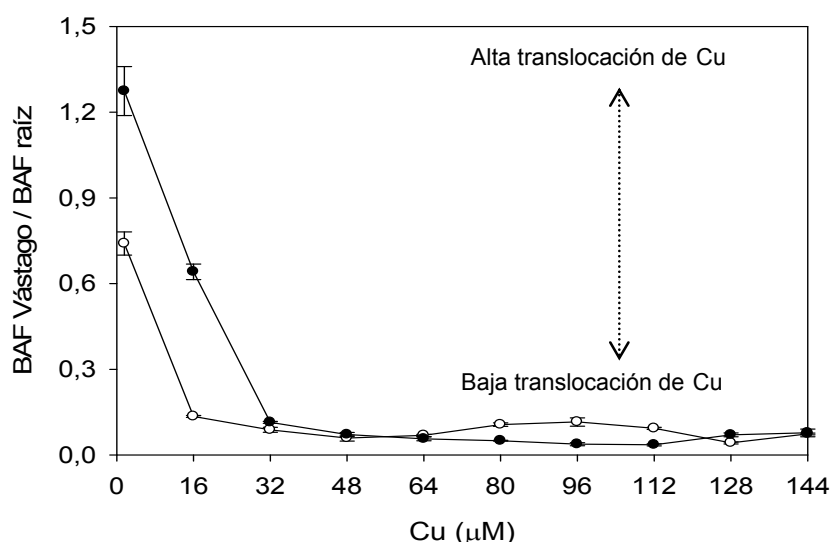


Fig. 4. Relación entre el $\text{BAF}_{\text{vástago}} / \text{BAF}_{\text{raíz}}$ y las dosis de Cu aportadas al medio de cultivo, en plantas de altramuza (●) y soja (○) tratadas con dosis crecientes de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$)

1.2. Síntomas visuales y efecto del Cu sobre el crecimiento

El conjunto de síntomas visuales de toxicidad que presentan las plantas de altramuza y soja tratadas con dosis elevadas de Cu aparecen resumidos en la [Tabla 1](#). En general, al aportar $32 \mu\text{M}$ de Cu ya se observa un acortamiento del tallo, curvaturas y reducción del tamaño foliar, principalmente en las hojas jóvenes de soja y en las adultas de altramuza, así como un oscurecimiento de la cabellera radicular de

ambas especies vegetales. A partir de niveles $> 32 \mu\text{M Cu}$, los síntomas mencionados se van intensificando, con la aparición de clorosis en las hojas de altramuz, acompañada de necrosis en las de soja. Con las dosis más altas (96-144 $\mu\text{M Cu}$) se observa un marchitamiento general de las plantas, muerte de los ápices de crecimiento, así como una defoliación intensa en el vástago de altramuz. Un aspecto general de las plantas de altramuz y soja tratadas con 1,6, 96 y 144 μM se muestra en la Fig. 5.



Fig. 5. Aspecto de las plantas de altramuz y soja cultivadas durante 14 días con 1,6, 96 y 144 $\mu\text{M Cu}$

Por otra parte, la incidencia de dosis crecientes de Cu sobre el peso fresco del vástago y la raíz de plantas de altramuz y soja, se ha expresado como la tasa de

crecimiento relativo de cada tratamiento con respecto a los valores que presenta el control (Fig. 6). En ambas leguminosas, el crecimiento de la parte aérea y de la raíz se ve afectado muy negativamente por el exceso de Cu suministrado. En altramu, el aporte de 16 μM Cu al medio de cultivo reduce un 14% el crecimiento de la planta, pero al suministrar 32 μM disminuye un 28% y 50%, respectivamente la tasa de crecimiento del vástago y la raíz en comparación a los valores del tratamiento control. Además, según aumenta la dosis de Cu en el medio de cultivo, se reduce más la tasa de crecimiento de ambos órganos, llegando a representar en torno al 59% en el vástago y al 70% en la raíz al cultivarlas con 144 μM Cu. En soja ocurre algo semejante, aunque las reducciones son ligeramente superiores en vástago y ligeramente inferiores a las que presenta la planta de altramu. Con la dosis de Cu más alta (144 μM) el porcentaje de reducción del crecimiento es mucho más intenso (89% - vástago; 68% - raíz).

Tabla 1. Síntomas visuales observados en las plantas de altramu y soja cultivadas durante 14 días con dosis crecientes de Cu

Dosis Cu (μM)		
	Altramu	Soja
32 - 48	Menor altura del tallo. Hojas inferiores y superiores más pequeñas y curvadas hacia el haz. Raíces oscuras, más cortas y con menor número de raíces laterales. Además, los ápices radicales estaban engrosados y deformados.	Menor altura del tallo. Hojas superiores e inferiores más pequeñas y estas últimas estaban curvadas hacia el envés. Clorosis en las hojas superiores. Oscurecimiento de la cabellera radical. Raíces laterales más cortas y ápices engrosados y deformados.
64 - 80	Además de los síntomas mencionados se observó la aparición de una ligera clorosis en las hojas inferiores.	Aparte de lo anterior, las plantas presentaban clorosis intervenal en hojas inferiores y necrosis en las hojas superiores.
96 - 112	Clorosis en las hojas inferiores. Vástago con claros síntomas de marchitamiento. Muerte del ápice de la raíz principal.	Necrosis en los bordes de las hojas inferiores. Hojas inferiores adquieren de nuevo una tonalidad verde.
128 - 144	Vástago y raíces prácticamente muertos.	Marchitamiento de la parte aérea y muerte del ápice de la raíz principal.

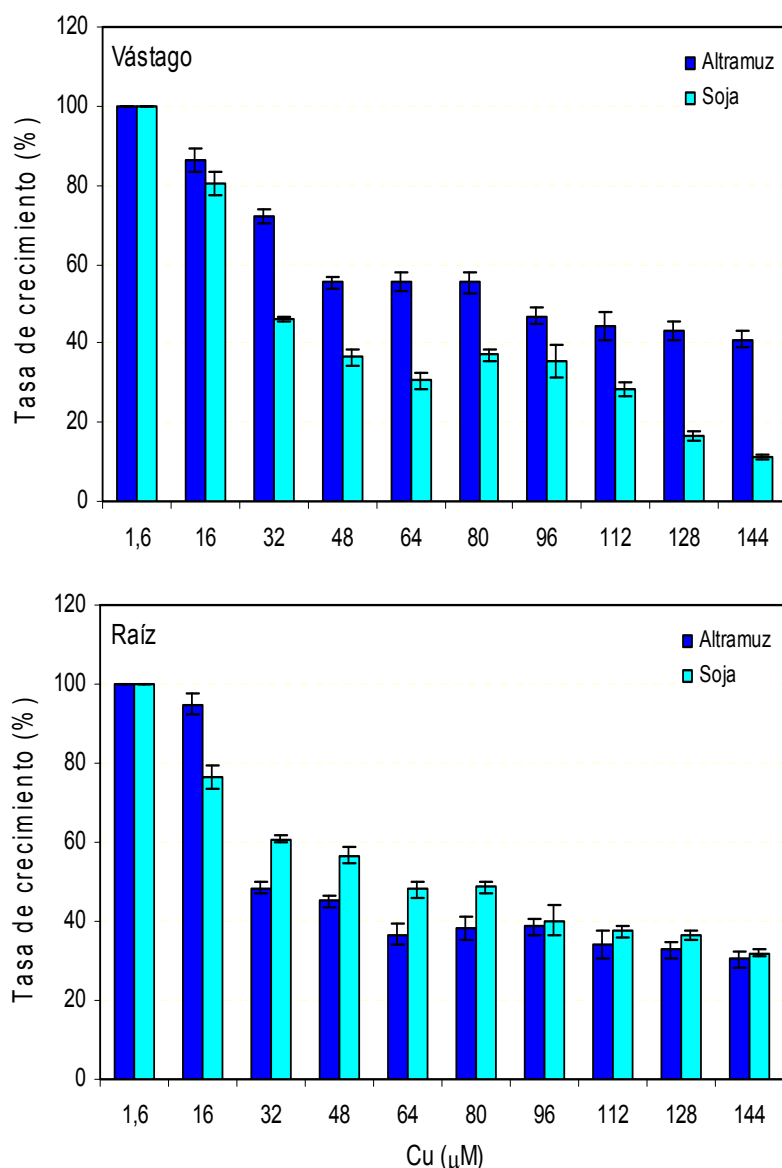


Fig. 6. Tasa de crecimiento relativo del vástago y la raíz de plantas de altramus y soja cultivadas durante 14 días con dosis crecientes de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$)

1.3. Índices de absorción y acumulación de Fe, Mn y Zn en función de la dosis de Cu

Para evaluar el efecto de dosis crecientes de Cu sobre la concentración de Fe, Mn y Zn en planta se ha calculado la tasa de absorción neta (Zornoza y col., 2002), así como diversos índices de acumulación efectiva total y en vástago, los % de translocación y el cociente entre la concentración del metal en parte aérea y raíz (Greger y col., 2005). En el caso del Fe (Tabla 2), en altramus la absorción neta se

reduce por efecto del Cu, y lo mismo sucede con el índice de acumulación efectiva total y en parte aérea; disminuyendo para los tres, en torno a un 70% con la dosis más alta de Cu. Sin embargo, el aumento en la dosis de Cu no afecta al % de translocación de Fe, pero duplica el coeficiente de concentración de Fe en las plantas de altramuz tratadas con 144 μM Cu. En soja, los índices estudiados disminuyen con el incremento de Cu en el medio de cultivo. Si bien, los porcentajes de reducción son algo menores; aproximadamente un 50% para la tasa de absorción neta, acumulación efectiva total y en vástago, y un 25% para el % de translocación.

Tabla 2. Resumen de los índices de absorción neta y eficacia de Fe en plantas de altramuz y soja tratadas con dosis crecientes de Cu

	Dosis de Cu (μM)					
	1,6	32	64	96	128	144
<i>Altramuz</i>						
Absorción neta ($\mu\text{g planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	0,445	0,200	0,175	0,180	0,164	0,135
Acumulación efectiva _{total} (%)	38,3	16,9	14,8	15,2	13,8	11,4
Acumulación efectiva _{vástago} (%)	13,7	4,4	5,3	4,1	4,7	3,9
Translocación (%)	36,1	26,3	35,9	27,6	34,6	34,1
$[\text{Fe}]_{\text{vástago}}/[\text{Fe}]_{\text{raíz}}$ (%)	49,7	40,3	78,7	57,1	91,3	90,6
<i>Soja</i>						
Absorción neta ($\mu\text{g planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	0,117	0,058	0,050	0,081	0,049	0,064
Acumulación efectiva _{total} (%)	9,9	4,9	4,2	6,8	4,1	5,4
Acumulación efectiva _{vástago} (%)	6,7	3,2	2,4	4,1	2,5	2,8
Translocación (%)	67,8	64,0	58,0	59,4	61,6	51,2
$[\text{Fe}]_{\text{vástago}}/[\text{Fe}]_{\text{raíz}}$ (%)	109,7	133,1	118,2	91,8	100,9	73,3

Los valores de absorción neta, porcentajes de acumulación efectiva, translocación y cociente entre la concentración del Mn en parte aérea y raíz de plantas de altramuz y soja se recogen en la **Tabla 3**. En altramuz, la absorción neta de Mn disminuye según aumenta la dosis de Cu en el medio de cultivo, reduciéndose hasta un 67% al cultivarlas con la dosis más alta. Un comportamiento similar muestran los % de acumulación efectiva total y en vástago (67%), así como el cociente entre las concentraciones (25%). Por el contrario, el exceso de Cu apenas modifica el % de translocación de Mn. En soja, los índices de absorción neta y

acumulación siguen la misma tendencia que en altramuz, salvo en el caso de la translocación que se observa una reducción paulatina al aumentar el aporte de Cu. Si se comparan los valores de Mn del tratamiento control y los procedentes de la dosis más alta, los descensos son del 68%, 69%, 78%, 32% y 54%, para la absorción neta, acumulación efectiva total y en vástago, translocación y cociente entre concentraciones, respectivamente.

Tabla 3. Resumen de los índices de absorción neta y eficacia de Mn en plantas de altramuz y soja sometidas a dosis crecientes de Cu

	Dosis de Cu (μM)					
	1,6	32	64	96	128	144
<i>Altramuz</i>						
Absorción neta ($\mu\text{g planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	0,717	0,360	0,264	0,259	0,266	0,230
Acumulación efectiva _{total} (%)	68,0	34,2	25,0	24,6	25,3	22,6
Acumulación efectiva _{vástago} (%)	64,8	31,3	23,0	22,7	23,6	21,1
Translocación (%)	95,3	91,5	91,6	92,0	93,3	93,4
$[\text{Mn}]_{\text{vástago}}/[\text{Mn}]_{\text{raíz}}$ (%)	1341,5	796,9	733,0	915,9	1025,1	1002,7
<i>Soja</i>						
Absorción neta ($\mu\text{g planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	0,480	0,150	0,099	0,163	0,171	0,152
Acumulación efectiva _{total} (%)	45,5	14,2	9,4	15,5	16,2	14,4
Acumulación efectiva _{vástago} (%)	32,5	10,8	7,6	12,8	7,9	7,3
Translocación (%)	71,4	76,0	80,1	82,1	47,3	48,7
$[\text{Mn}]_{\text{vástago}}/[\text{Mn}]_{\text{raíz}}$ (%)	122,4	225,7	335,9	262,3	52,5	56,7

Los índices de absorción neta y % de acumulación efectiva total y en vástago, translocación y cociente entre concentraciones de Zn en las dos especies estudiadas se muestran en la **Tabla 4**. Al igual que en los casos anteriores, la absorción neta de Zn en ambas leguminosas disminuye con la dosis de Cu, presentando una disminución con respecto al control del 59% en altramuz y 61% en soja cuando se cultivan con la dosis más alta de Cu (144 μM). Algo similar se observa en los índices de acumulación efectiva de ambos cultivos. Por el contrario, el % de translocación y el coeficiente de concentración de Zn en altramuz aumentan con la dosis, mientras que en soja disminuyen.

Tabla 4. Resumen de los índices de absorción neta y eficacia de Zn en plantas de altramus y soja tratadas con dosis crecientes de Cu

	Dosis de Cu (μM)					
	1,6	32	64	96	128	144
<i>Altramuz</i>						
Absorción neta ($\mu\text{g planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	0,100	0,072	0,053	0,048	0,047	0,041
Acumulación efectiva _{total} (%)	189,6	136,0	101,1	91,4	89,1	77,4
Acumulación efectiva _{vástago} (%)	68,0	60,1	51,1	46,0	45,8	45,1
Translocación (%)	36,0	44,2	50,5	50,3	51,4	58,1
$[\text{Zn}]_{\text{vástago}}/[\text{Zn}]_{\text{raíz}}$ (%)	53,2	69,6	112,5	124,4	118,6	150,6
<i>Soja</i>						
Absorción neta ($\mu\text{g planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	0,085	0,041	0,033	0,035	0,037	0,033
Acumulación efectiva _{total} (%)	161,4	77,7	61,8	67,1	70,9	62,3
Acumulación efectiva _{vástago} (%)	102,9	45,6	35,2	36,5	29,3	25,8
Translocación (%)	64,1	58,6	56,7	54,0	41,4	41,4
$[\text{Zn}]_{\text{vástago}}/[\text{Zn}]_{\text{raíz}}$ (%)	96,5	104,3	110,6	70,6	42,9	45,9

1.4. Efecto del exceso de Cu sobre la concentración de MDA y –SH

En la [Fig. 7](#) aparece representada la relación entre el nivel de MDA en hojas y raíces de plantas de altramus y soja en función de la dosis de Cu suministrada. En hojas de altramus, niveles de Cu comprendidos en el intervalo 32-64 μM Cu ocasionan que la producción de MDA se duplique con respecto a los valores de las plantas control. Con dosis de Cu comprendidas entre 64 y 122 μM se intensifica este efecto (2,3 veces) y con el nivel más alto (144 μM Cu) los valores iniciales se triplican. En resumen, el comportamiento del MDA foliar en plantas de altramus en función de la dosis de Cu, permite establecer una relación lineal y directa entre ambas variables ($R^2 = 0,883^{***}$; $P < 0,001$). En cambio, la relación encontrada en las hojas de soja es hiperbólica, aumenta 1,6 veces al pasar de 1,6 a 32 μM Cu; a partir de esa dosis la producción de MDA se mantiene constante. En raíz, el aporte de 32 μM de Cu incrementa de forma significativa el contenido de MDA en altramus (60%), pero no altera el de soja. En este último cultivo, el nivel de MDA y dosis de Cu están inversamente relacionados ($R^2 = 0,812^{***}$; $P < 0,001$), aunque es necesario

suministrar niveles de Cu > 64 μM para provocar un descenso significativo de este indicador de estrés.

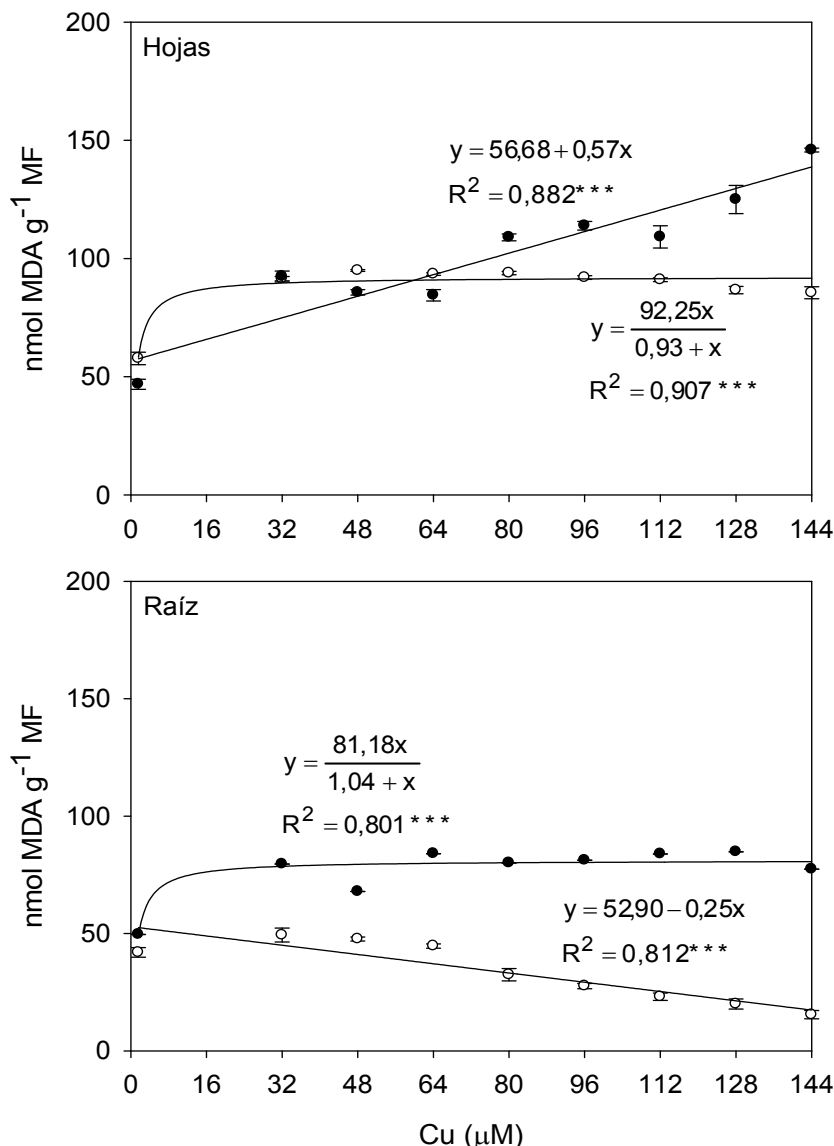


Fig. 7. Concentración de MDA en hojas y raíces de plantas de altramuz (●) y soja (○) cultivadas con dosis crecientes de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$)

El efecto de dosis crecientes de Cu sobre la concentración de $-\text{SH}$ totales en hojas y raíces de plantas de altramuz y soja tratadas con dosis crecientes de Cu se muestra en la Fig. 8. En las hojas de altramuz aumentan con la dosis, especialmente al pasar del tratamiento de 1,6 μM al intervalo comprendido entre 32 y 96 μM Cu; para dosis superiores a 96 μM , la concentración de $-\text{SH}$ en las hojas de altramuz

permanece constante. La relación encontrada entre ambas variables se ajusta a una hipérbola. En las raíces de altramuza, la concentración de –SH casi se triplica, en comparación a los valores del control, para todas las dosis de Cu suministradas. Aunque los valores de –SH en el intervalo 32-144 μM Cu no experimentan variaciones significativas. En las hojas de soja, se ha detectado una relación lineal y positiva entre dosis de Cu y concentración de –SH ($R^2 = 0,73^{**}$; $P < 0,01$). En raíces de soja, el aumento en el aporte de Cu sólo modifica la concentración de –SH al comparar el control con 32 μM Cu, el resto de tratamientos no muestran una tendencia definida.

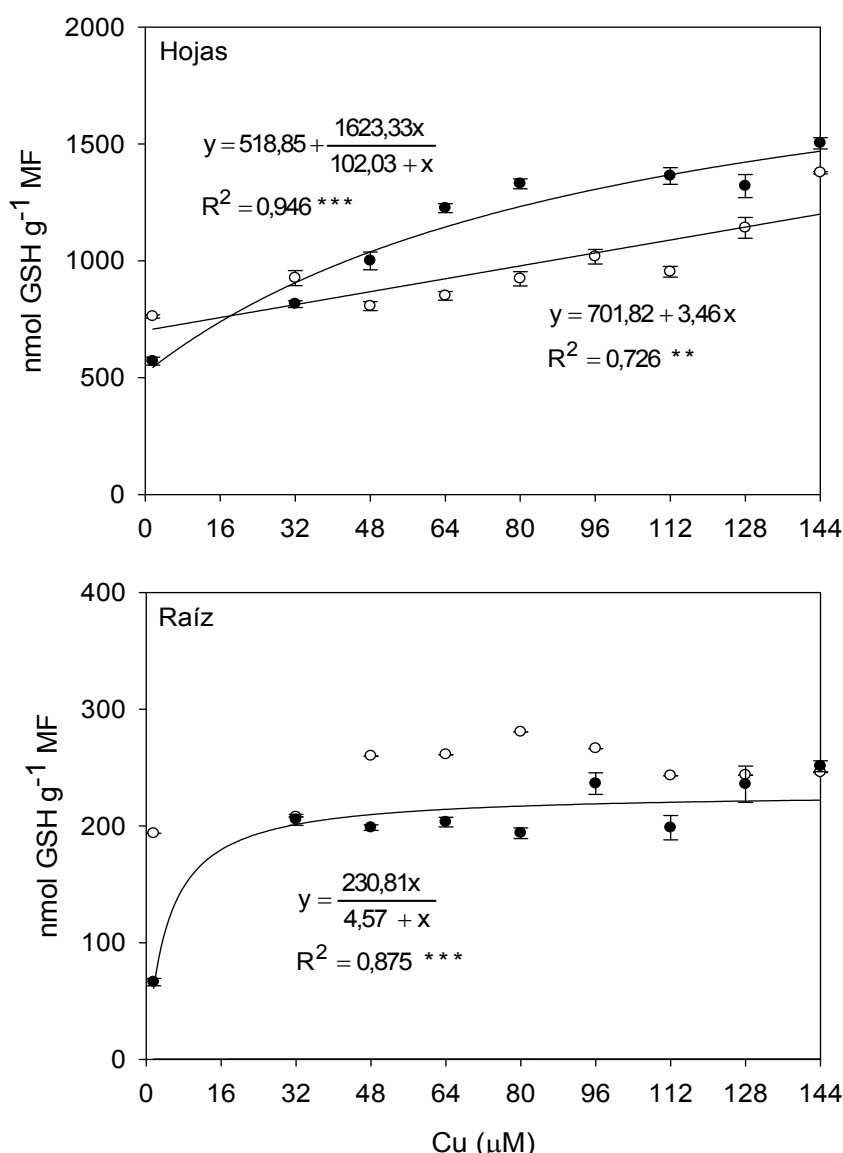


Fig. 8. Concentración de –SH en hojas y raíces de plantas de altramuza (●) y soja (○) cultivadas con dosis crecientes de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$)

2.- Discusión de ecotoxicidad y bioacumulación de Cu en plantas de altramuiz y soja

En el capítulo anterior se observó que el suministro de dosis de Cu $< 16 \mu\text{M}$ casi no provocó efectos perjudiciales sobre el crecimiento de las especies vegetales estudiadas y, además, que las cinéticas de acumulación de Cu en el vástago y sistema radicular de ambas leguminosas seguían una tendencia hiperbólica y lineal, respectivamente. Lo que sugiere que hasta dosis de Cu $\leq 16 \mu\text{M}$, las raíces de altramuiz y soja seguían teniendo capacidad para acumular Cu, ya que no se había alcanzado la saturación, mientras que el transporte del metal se ralentizaba a partir de dosis $> 10 \mu\text{M}$ Cu. Con la finalidad de profundizar en estos aspectos y estimar la ecotoxicidad y la capacidad de las plantas de altramuiz y soja para bioacumular Cu, se plantearon nuevos experimentos en las mismas condiciones, pero con dosis más altas del metal pesado (16-144 μM).

De los resultados obtenidos en estos ensayos, se observa que la pauta de absorción neta de Cu es lineal en ambas leguminosas, aunque con mayor pendiente en soja que en altramuiz (Fig. 1). Estos resultados concuerdan claramente con la distinta capacidad acumulativa de Cu que exhiben los dos cultivos. En las raíces de altramuiz, la acumulación de Cu es prácticamente lineal hasta 64 μM y después permanece constante; mientras que en las raíces de soja, aumenta hasta 112 μM de forma casi proporcional a la dosis; luego experimenta un fuerte incremento (Fig. 3). A elevadas concentraciones de Cu en el medio, la absorción pasiva de Cu es claramente mecanismo dominante, ya que existe un daño en la pared celular y en la integridad de las membranas de las células de la raíz y esto ocasiona una pérdida de control en el mecanismo de absorción activa (Fernandes y Henriques, 1991). En vástago, la tasa de acumulación de Cu en ambas especies vegetales aumenta lentamente y en la misma cuantía hasta 64 μM , a partir de esa dosis, el comportamiento de las especies es bastante diferente. Así, la capacidad de acumulación de Cu del vástago de altramuiz se satura en 112 μM , mientras que en soja no, sigue dando valores paulatinamente más altos hasta 128 μM y luego la capacidad de acumulación experimenta un gran

aumento (Fig. 2). Esto podría ser debido a un efecto de concentración del metal en los tejidos de la raíz, motivados por un excesivo aporte de Cu. Pero también a cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática de las células de la raíz, así como a desequilibrios en los mecanismos que regulan el transporte a larga distancia. En este sentido, Bruus Pedersen y col. (2000) encontraron que el exceso de Cu en el medio de cultivo, alteraba los sistemas de control que regulan y mantienen bajas concentraciones de Cu en la parte aérea de *Fallopia convolvulus*.

Además, para cada cultivo los valores de concentración de Cu en las raíces concuerdan bastante bien con los del vástago tanto en la tendencia como en la cuantía. De tal forma que ambas variables están directa- y significativamente correlacionadas ($R^2 = 0,770^{***}$; $P < 0,001$ en altramuz) y ($R^2 = 0,899^{***}$; $P < 0,001$ en soja). Asimismo, se ha detectado una relación positiva y muy significativa entre la cantidad de Cu exportada y la suministrada a ambos cultivos. Tanto en altramuz como en soja ambas variables exhiben una relación lineal ($R^2 = 0,972^{***}$; $P < 0,001$) y ($R^2 = 0,992^{***}$; $P < 0,001$), respectivamente (Fig. 9). La planta de soja exporta el doble de Cu que la de altramuz; con valores que oscilan entre 9,7 a 600,9 $\mu\text{g Cu planta}^{-1}$ en la primera especie y desde 5,9 a 336,4 $\mu\text{g Cu planta}^{-1}$ en la última.

La tasa de absorción y por tanto de exportación de un elemento está directamente asociada con la morfología de la raíz. Algunos autores (Das y col., 1997; Bruus Pedersen y col., 2000) encuentran que las plantas dotadas de una cabellera radicular con numerosas raíces delgadas podían acumular más Cu que aquellas que no tenían esas características morfológicas. An (2004) observan que la raíz pivotante con abundantes raíces finas de la planta de pepino, retiene mayor cantidad de Cd que el sorgo, el cual tiene una raíz principal más corta, raíces laterales más gruesas y de menor longitud. Asimismo, Cao y col. (2007a) atribuyen a diferencias morfológicas de la raíz, la distinta tasa de acumulación de Cd que presentan maíz y soja.

La respuesta de las plantas frente al estrés de Cu u otro MP va a depender, entre otras cosas, de cómo se distribuyan los metales entre los distintos órganos del vegetal (Kabata-Pendias y Pendias, 2000; Prasad, 2004). En estos experimentos, se

han encontrado las siguientes pautas de distribución de Cu (estimadas como % de contribución del contenido en cada órgano al total exportado por la planta): hojas > raíz > tallos en altramuz procedente del tratamiento control. Sin embargo a partir de 32 μM Cu se detecta un cambio en esta especie vegetal (raíz > hojas > tallos). En soja, la pauta de distribución es raíz > hojas > tallos con independencia de la dosis de Cu aplicada. Por ello, en ambos cultivos, el exceso de Cu se encuentra localizado fundamentalmente en la raíz. Este órgano, es el lugar preferente de acumulación de As (Vázquez y col., 2006), Cd (Zornoza y col., 2002), Cu (Jung y col., 2003), Hg (Esteban y col., 2008) y Zn (Pastor y Hernández, 2006) en la planta de altramuz. Angelova y col. (2003) encuentran que la soja acumula el Cu fundamentalmente en la raíz, mientras que el Cd lo hace en la parte aérea (Cao y col., 2007a).

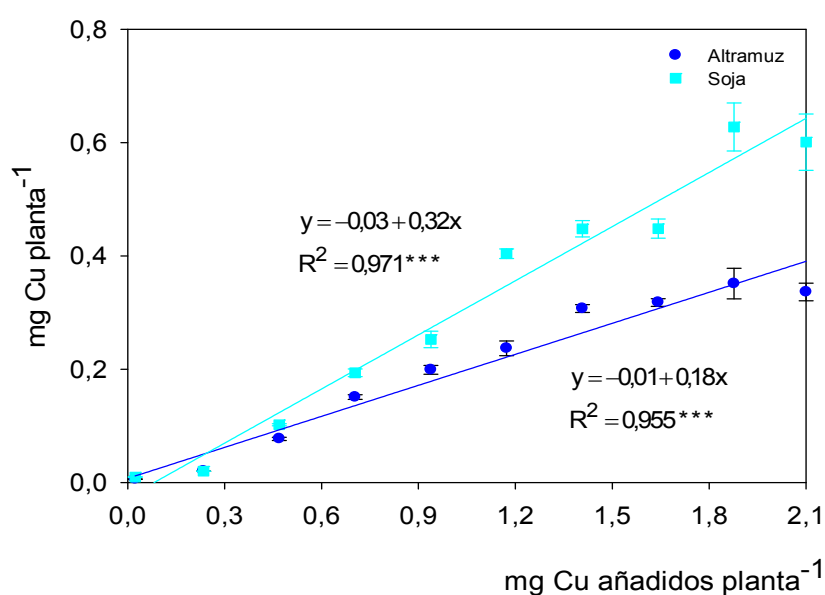


Fig. 9. Exportación total de Cu en plantas de altramuz y soja sometidas a dosis crecientes de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$)

Además, en estos ensayos se ha detectado que a medida que aumenta la dosis de Cu añadida a las plantas, el cociente entre los índices de bioacumulación del vástago y la raíz se reduce (Fig. 4). Resultados similares se han observado en cebada (Ali y col., 2004); maíz, pepino, sorgo y trigo (An, 2006) tratados con Cu. Si bien, cabe destacar que aunque la tasa de Cu transportado hacia el vástago de altramuz y soja se reduce por efecto de la dosis, experimenta un aumento a partir de dosis $\geq 128 \mu\text{M}$ en

la primera y 144 μM Cu en la segunda. Estos resultados sugieren que a dosis muy elevadas del MP, las raíces, probablemente muy dañadas por el Cu, pierden sitios específicos de unión, retienen menos y, por tanto, existe una mayor tasa de transporte de Cu hacia las hojas. [Fernandes y Henriques \(1991\)](#) observan que los tejidos muertos, resultado del exceso de Cu, presentan concentraciones más altas que los vivos. Este hecho lo atribuyen a una pérdida de control del vegetal sobre los mecanismos de absorción del metal.

Los valores de concentración de Cu encontrados en las hojas de altramuz y soja tratadas con dosis $\geq 32 \mu\text{M}$ de Cu, se encuentran dentro del intervalo de toxicidad ($> 25 \text{ mg kg}^{-1}$ MS - altramuz; $> 30 \text{ mg kg}^{-1}$ MS - soja) que señalan diversos autores ([Marschner, 1995](#); [Reuter y Robinson, 1997](#); [Kabata- Pendias y Pendias, 2000](#)). En estos ensayos, el suministro de Cu entre 32 y 144 μM hace que las hojas de altramuz den valores comprendidos entre 36 y 171 mg kg^{-1} MS, mientras que en las de soja oscilen entre 38 y 243 mg Cu kg^{-1} MS. Las raíces de las plantas tratadas con la dosis más alta (144 μM) tienen concentraciones de Cu realmente elevadas (4258 mg kg^{-1} MS - altramuz; 10661 mg kg^{-1} MS - soja). Estos valores ponen claramente de manifiesto la elevada capacidad de la raíz de soja para acumular Cu.

Como consecuencia de la acumulación de niveles elevados de Cu en los tejidos vegetales, aparecen una serie de síntomas visuales de toxicidad, y entre los más frecuentes se encuentran clorosis y necrosis en las hojas, acortamiento del tallo, así como pardeamiento y alteración de la morfología radicular ([Marschner, 1995](#); [Kabata- Pendias y Pendias, 2000](#); [Yruela y col., 2005](#)). En la mayoría de los casos, la raíz muestra mayor susceptibilidad que el vástago al exceso de Cu y esto es, probablemente, una consecuencia de la alta acumulación del metal en este órgano vegetal ([Fernandes y Henriques, 1991](#)). Además, se ha observado que el proceso de elongación de la raíz es más sensible al exceso de Cu que la iniciación radicular ([Fernandes y Henriques, 1991](#)).

En este trabajo se ha observado que el aporte de concentraciones de Cu ≥ 32 μM produce diversos síntomas de toxicidad en las especies estudiadas (Tabla 1; Fig. 5). Todos ellos están recogidos en la bibliografía, pero los más llamativos, se refieren al volumen de la cabellera radicular y especialmente a la de altramuz. Así, se ha apreciado un menor desarrollo y engrosamiento de las raíces laterales y de la principal, un oscurecimiento de este órgano vegetal, así como una deformación y engrosamiento del ápice radical. Estos síntomas se intensifican con la dosis de Cu; provocando la concentración más alta de Cu (144 μM), casi la muerte de las plantas de altramuz. Panou-Filothéou y col. (2001) observaron síntomas similares en orégano. Lequeux y col. (2010), encontraron una reducción de la longitud de la raíz principal y secundarias, así como un aumento en el número y la densidad de estas últimas al someter a plantas de *Arabidopsis thaliana* a 50 μM de Cu. Según dichos autores la aparición de un mayor número de raíces laterales puede ser atribuida a un menor desarrollo de la principal. Asimismo, Panou-Filothéou y Bosabalidis (2004) detectaron que el engrosamiento del ápice de la raíz principal y laterales se debe a una restricción en la elongación celular.

La inhibición del crecimiento es habitual en las plantas que experimentan estrés por Cu. Este hecho ha sido ampliamente descrito en diversas especies vegetales como son *Arabidopsis* (Lequeux y col., 2010), arroz (Xu y col., 2006), caupí (Kopitteke y Menzies, 2006), cebada (Ali y col., 2004), maíz (Ouzounidou y col., 1994), orégano (Panou-Filothéou y col., 2001), pepino, sorgo y trigo (An, 2006). La inhibición del peso fresco observada en estos ensayos (Fig. 6), ha sido especialmente intensa en el vástago de soja (89%), mientras que las raíces de ambas leguminosas experimentan unos % de inhibición cercanos al 70%. Las diferencias entre especies se atenúan cuando se consideran los pesos secos de las plantas. En la Fig. 10, aparece representada la relación entre el peso seco del vástago y la raíz en función de la concentración de Cu en los órganos de la planta. Se puede observar como a medida que aumenta la concentración de Cu se reduce paulatinamente el peso seco. En parte aérea sigue una tendencia logarítmica para ambas especies vegetales. Sin embargo en raíz, existe una relación lineal en altramuz y logarítmica en soja.

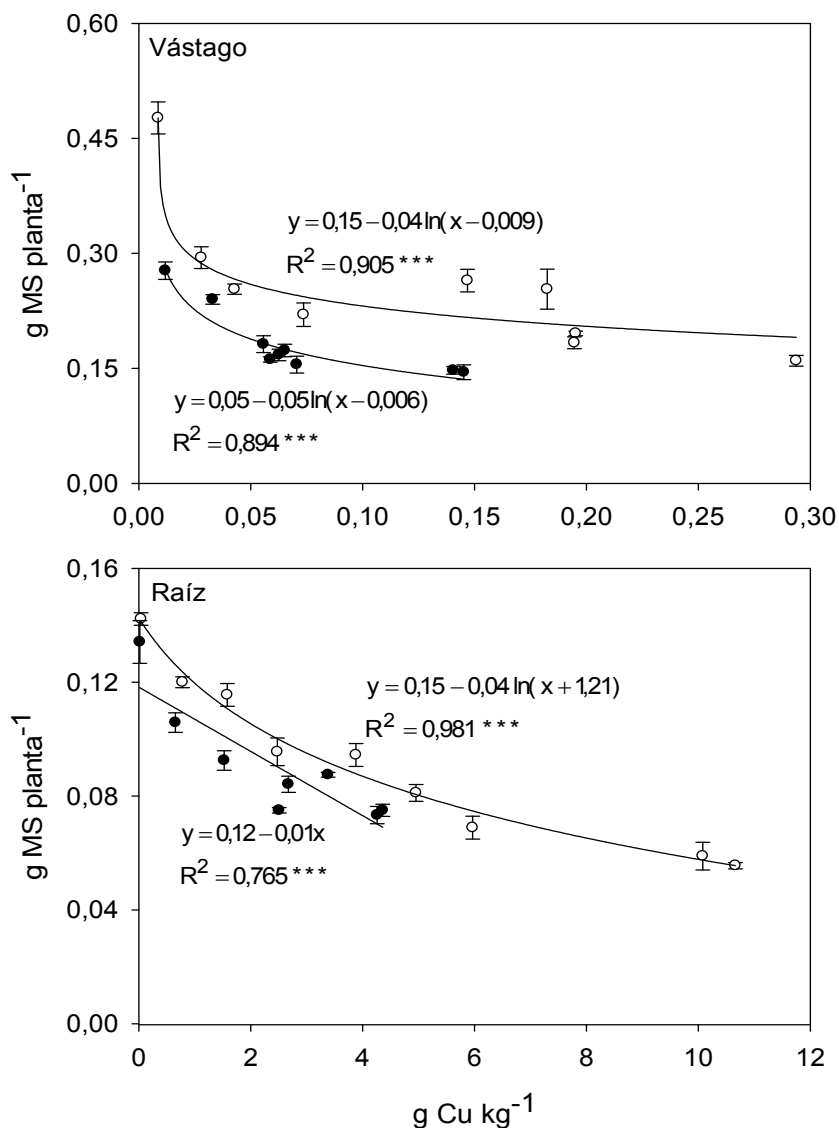


Fig. 10. Relación entre el peso seco del vástago y de la raíz de altramus (●) y soja (○) y concentración de Cu. Las barras verticales indican (±) el E.T. de la media ($n = 4$)

El exceso de Cu ha afectado claramente al contenido de agua de los órganos vegetales de altramus y soja. Según [Panou-Filothéou y col. \(2001\)](#), la severa reducción del volumen de la raíz de las plantas a causa de la toxicidad de Cu restringe enormemente la absorción de agua. En este sentido, para mantener un balance hídrico adecuado en los tejidos, las plantas limitan la tasa de transpiración. Altramus y soja tienen un comportamiento distinto en cuanto a la economía del agua; la primera tiene grandes requerimientos, mientras que esto no le sucede a la segunda. Por ello, bajo condiciones de estrés por Cu, el contenido de agua de los tejidos se ha

visto modificado en diferente cuantía. Así, los % de humedad de las hojas de soja se reducen un 55%, mientras que en altramuz casi no varían, si se comparan los valores del control con los de la dosis más alta de Cu (144 μM).

El grado de sensibilidad de las plantas al exceso de Cu varía en función de la dosis aplicada, de la especie y del órgano vegetal (Ouzounidou y col., 1995; Burkhead y col., 2009). Para evaluar y comparar el nivel de toxicidad entre ambas leguminosas se han determinado dos índices: CTC_{10%} - concentración tóxica crítica (Poschenrieder y Barceló, 2004) y EC₅₀ - concentración efectiva de Cu que reduce el peso seco en un 50% (Cao y col., 2007b) en la parte aérea y subterránea de las plantas (Tabla 5). Del examen de los datos se puede deducir que, para reducir un 10% el crecimiento de la planta, el altramuz necesita acumular concentraciones más altas de Cu en sus tejidos que la de soja. Si bien, las diferencias entre ambos cultivos son de poca cuantía. Además, en ambas especies se observan valores más altos para la raíz que para la parte aérea. Por tanto, concentraciones más bajas de Cu en el vástago que en raíz son capaces de reducir un 10% el peso seco de la planta. Los valores de CTC_{10%} de Cu encontrados en vástago y raíz de otras especies vegetales han sido, respectivamente de 55 y 3100 mg kg^{-1} MS en *Phragmites australis* (Ali y col., 2002), 67 y 41 mg kg^{-1} MS en *Vigna mungo* (Kalyanaraman y Sivagurunathan, 1993), 20 y 66 mg kg^{-1} MS en *Vigna unguiculata* (Kopittke y Menzies, 2006), 21 y 170 mg kg^{-1} MS *Zea mays* (Ali y col., 2002). Los valores obtenidos en altramuz y soja son bastante parecidos a los de maíz. Por otro lado, las concentraciones de Cd y Zn que reducen un 10% el crecimiento de la raíz de altramuz ascienden a 482 mg kg^{-1} MS y 1492 mg kg^{-1} MS, respectivamente (Sánchez-Pardo y col., 2008). Al comparar estos valores con los obtenidos en este trabajo, se pone de manifiesto que la planta de altramuz parece que exhibe una menor tolerancia al exceso de Cu que a dosis elevadas de Cd y Zn.

En el capítulo II, se ha visto cómo el aporte de 16 μM de Cu reduce más intensamente el crecimiento del vástago de altramuz y el de la raíz de soja. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este ensayo, ya que la concentración de Cu en la parte aérea de altramuz (22 mg Cu kg^{-1} MS) y en la raíz de soja (171 mg Cu kg^{-1} MS)

¹ MS) superan a los estimados mediante el índice CTC_{10%}. En cambio, los obtenidos para la raíz de altramuz (92 mg Cu kg⁻¹ MS) y el vástago de soja (14 mg Cu kg⁻¹ MS) no los sobrepasan.

Tabla 5. Parámetros de toxicidad (EC₅₀ y CTC_{10%}) en base al peso seco del vástago y raíz de plantas de altramuz y soja cultivadas con dosis crecientes de Cu. EC₅₀ calculado mediante ajuste a una curva logística estándar de tres parámetros y CTC_{10%} a una logarítmica de un parámetro característicos del programa SigmaPlot

Parámetros de toxicidad		
	Vástago	Raíz
<i>Altramuz</i>		
CTC _{10%} (mg Cu kg ⁻¹ MS)	18,2	101,2
EC ₅₀ (μM)	38,2	32,1
<i>Soja</i>		
CTC _{10%} (mg Cu kg ⁻¹ MS)	16,6	95,0
EC ₅₀ (μM)	41,7	111,0

En los que respecta al EC₅₀ de las dos especies estudiadas, es la soja la que exhibe valores más altos. Esto significa que serían necesarias dosis mayores de Cu para reducir un 50% el crecimiento del vástago y la raíz de esta leguminosa (Tabla 5). Además, la parte aérea de altramuz presenta un valor de EC₅₀ más elevado que la raíz, mientras que en soja ocurre lo contrario. De lo anterior se puede deducir que en altramuz el órgano más susceptible al Cu sería la raíz, mientras que en soja lo sería la parte aérea. Otros autores (Ali y col., 2004; An, 2006) encuentran en la parte aérea de cebada, maíz, pepino, sorgo y trigo valores de EC₅₀ más altos que en raíz.

De los parámetros toxicológicos (CTC_{10%} y EC₅₀) obtenidos se deduce que a concentraciones bajas de Cu < 16 μM la planta de soja se muestra algo más sensible al Cu que la de altramuz. En cambio a dosis ≥ 16 μM es la soja la que se muestra más tolerante al Cu. Además, dado que el valor de EC₅₀ obtenido en los órganos de altramuz no es muy alto, indicaría que la sensibilidad de esta especie parece relativamente alta. An (2006) encontraron que entre maíz, pepino, trigo y sorgo, este último cultivo fue el que se mostró más sensible al Cu, al tener los valores de EC₅₀ más

bajos. Por otro lado, [Cao y col. \(2007a\)](#) observan que la planta de soja se comporta como una especie menos tolerante a la toxicidad por Cd que la de maíz, y en ambos cultivos, es la raíz el órgano más susceptible al MP.

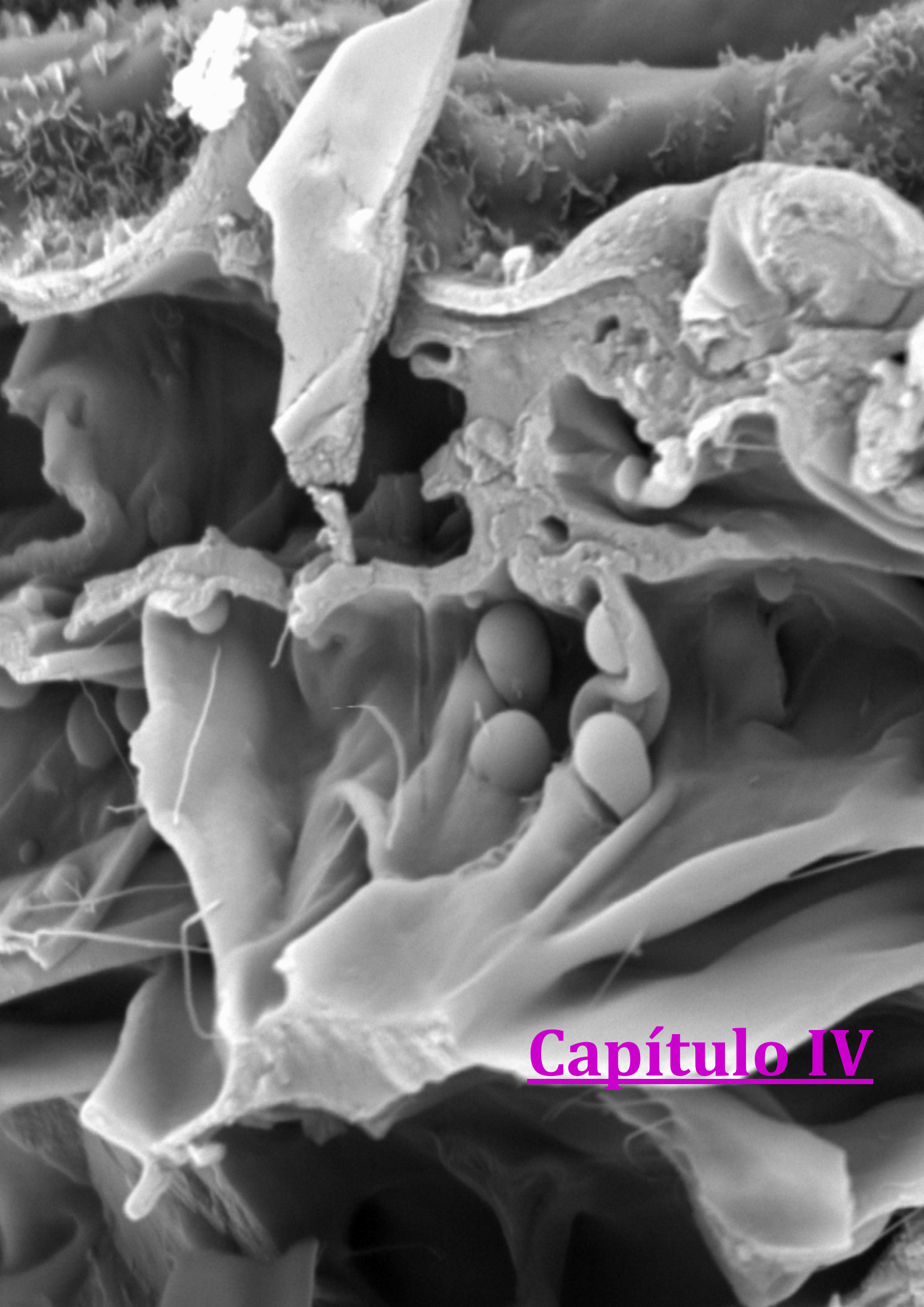
Otra causa de la reducción del crecimiento en condiciones de estrés por Cu, puede ser atribuida a desequilibrios en la nutrición mineral de las plantas. Los cuales pueden estar originados por una disminución de la absorción de determinados nutrientes, a causa de daños irreversibles en la raíz y también por procesos de interacción entre nutrientes ([Ouzounidou y col., 1995](#); [Kopittke y Menzies, 2006](#)). Se ha visto que el exceso de Cu puede tener un efecto negativo en la absorción y translocación de Ca, Fe, K, Mg y Zn en determinadas especies vegetales ([Kabata-Pendias y Pendias, 2000](#); [Ali y col., 2002](#); [Kopittke y Menzies, 2006](#); [Lequeux y col., 2010](#)). En este ensayo se han detectado alteraciones en la tasa de absorción neta y en los índices de eficacia de Fe, Mn y Zn por efecto de la toxicidad de Cu ([Tablas 2-4](#)). [Pätsikakä y col. \(2002\)](#) observaron que el exceso de Cu producía una deficiencia de Fe en plantas de judía cultivadas en hidroponía. Por el contrario, [Panou-Filotheou y col. \(2001\)](#) en orégano, no encuentran este hecho. Un efecto sinérgico Cu-Fe ha sido descrito por [Kitagishi y Yamane \(1981\)](#) en plantas de arroz y por [Lanaras y col. \(1993\)](#) en plantas de trigo. Pero también se ha visto una relación antagónica Cu-Fe bajo condiciones de estrés por Cu ([Foy y col., 1978](#); [Wallace y Cha, 1989](#)). [Bernal y col. \(2007\)](#), observan un descenso de la absorción Fe pero un incremento de la de Zn cuando aumenta el Cu en el medio externo. Asimismo, [Herbik y col. \(2002\)](#) detectaron un antagonismo entre Cu y Zn en *Chlamydomonas reinhardtii*.

La concentración de estos dos elementos se ve afectada de distinta forma dependiendo de la especie vegetal considerada ([Panou-Filotheou y col., 2004](#); [Ke y col., 2007](#)). La absorción y la acumulación efectiva de Mn y Zn en las plantas de soja tratadas con de 32 μM de Cu, experimentan una mayor reducción que en la de altramuz, en cambio, los porcentajes de reducción del Fe son similares en ambas especies. Por el contrario, los índices de acumulación de Mn y Zn disminuyen porcentualmente por igual al suministrar 144 μM Cu en ambas leguminosas, mientras

que los de Fe descienden de forma más intensa en altramu. Además, cabe destacar que con independencia de la dosis de Cu, la planta de altramu absorbe y acumula una mayor cantidad de Fe, Mn y Zn que la de soja. Sin embargo, la última especie transporta un mayor porcentaje de Fe y Zn a la parte aérea, pero menor de Mn que la de altramu.

Por otro lado, el suministro de dosis elevadas de Cu a la planta de altramu ha disparado la producción de MDA en las hojas. En la raíz el aumento es más tenue. En las hojas de soja, el aporte de dosis crecientes de Cu produce el mismo efecto que en altramu, en cambio no provoca alteraciones en el nivel de MDA de la raíz ([Fig. 7](#)). Como se comentó en el capítulo II, el exceso de Cu produce la formación de ROS en los tejidos, lo que puede causar alteraciones en los lípidos, las proteínas y el ADN ([Drazkiewicz y col., 2004](#)). La peroxidación de lípidos se usa como un indicador válido de la respuesta al estrés por metales pesados. Ciertos autores ([Gonnelli y col., 2001](#); [Hartley-Whitaker y col., 2001](#)) han detectado diferencias en el contenido de MDA entre especies sensibles y tolerantes al Cu, encontrando valores más altos en las primeras.

Otro indicador de estrés que normalmente aumenta con la concentración de Cu son los -SH totales. En este caso, la exposición de las plantas de altramu y soja a dosis $\geq 32 \mu\text{M}$ de Cu estimula la producción de -SH en las hojas de ambas leguminosas y en la raíz de altramu, sin embargo, no provoca variaciones en las raíces de soja. Los incrementos de MDA y -SH de los tratamientos de Cu respecto al control, apuntan a que los síntomas de toxicidad de Cu en ambas leguminosas son más acusados en las hojas, y que es la planta de altramu la que se muestra más sensible al estrés por Cu. Además, las plantas de soja tienen unos niveles basales de -SH más altos en hojas (1,3 veces) y raíz (2,9 veces) que las de altramu. Esto puede ser una de las causas por lo que esta leguminosa muestre un grado menor de estrés oxidativo que la de altramu. Además el nivel tan alto de -SH que presentan las raíces de soja puede ser que las proteja, en cierta medida, del estrés oxidativo en este órgano.

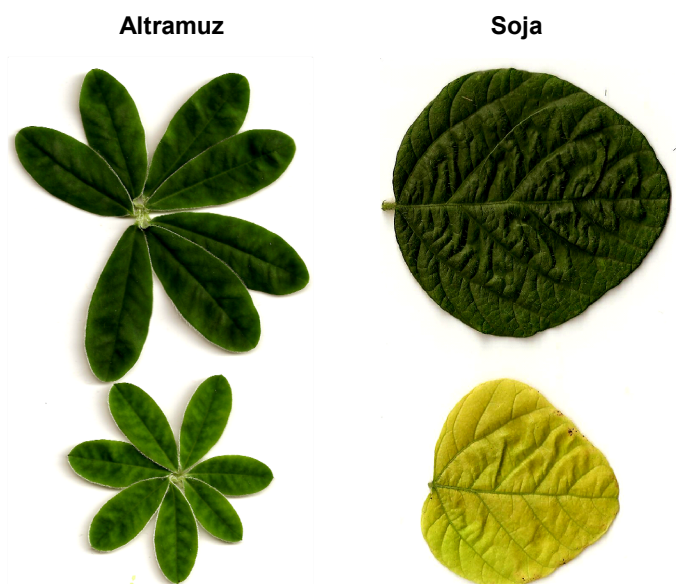


Capítulo IV

1.- Resultados de alteraciones morfológicas, estructurales y fisiológicas producidas por el exceso de Cu en plantas de altramuz y soja

1.1. Índices morfológicos de desarrollo foliar

Para evaluar el efecto del exceso de Cu sobre aspectos morfológicos de las hojas de las plantas de altramuz y soja tratadas con 1,6 y 24 μM de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), se han calculado diversos parámetros, como son el área foliar (LA), el número de hojas (NH), proporción de área foliar (LAR), el espesor de la hoja (LT), la cantidad de peso seco localizado en las hojas (LMR) y el área foliar específica (SLA). Los resultados obtenidos para cada especie vegetal y dosis de Cu se muestran en la Fig. 1. En altramuz, el LA, NH, LT y LMR se ven significativamente disminuidos por el aporte de 24 μM de Cu, con porcentajes de reducción del 68%, 63%, 47% y 36%, respectivamente, en comparación a los valores que muestran las plantas control. Por el contrario, la dosis más alta de Cu (24 μM) causa un aumento del 40% en el índice SLA y la proporción de área foliar (LAR) no se ve modificada significativamente en esta especie vegetal. En soja, el exceso de Cu (24 μM) también reduce de forma significativa el LA (64%), NH (29%) y del LMR (9%). Si bien, otros índices como el SLA, el LAR y el LT no se ven afectados. El aspecto de los folíolos de las hojas de altramuz y soja cultivadas durante 35 días con las dos dosis de Cu se muestra en la Fig. siguiente:



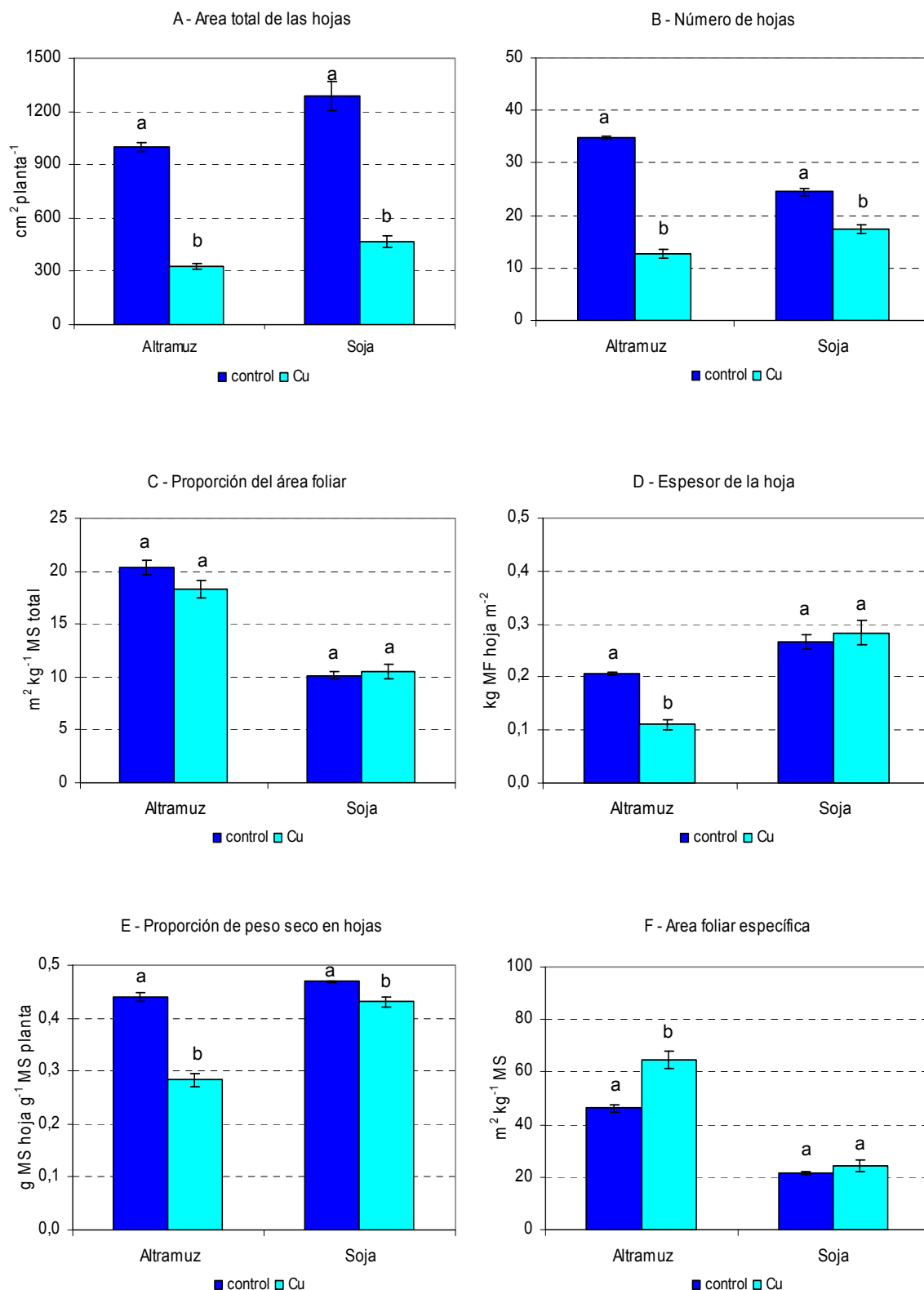


Fig. 1. Índices de desarrollo foliar de plantas de altramuz y soja tratadas con 1,6 μ M (control) y 24 μ M de Cu. Área total de la hoja (A), número de folíolos (B), proporción del área foliar (C), espesor de la hoja (D), proporción de peso seco en hoja (E) y área foliar específica (F). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para cada dosis de Cu se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

1.2. Estructura de la hoja

Para estudiar el efecto del exceso de Cu sobre la ultraestructura de las hojas de altramuz y soja se ha empleado microscopía electrónica de barrido a baja temperatura (LTSEM). Las hojas de altramuz (Figs. 2A-2C) y soja (Figs. 3A-3C) procedentes del tratamiento control (1,6 μM Cu) muestran una estructura bien organizada, presentando del haz al envés, la epidermis superior (adaxial), el mesófilo con los haces vasculares y la epidermis inferior (abaxial). La epidermis superior, recubierta por la cutícula, está constituida por una única capa de células elípticas con un contorno ondulado en altramuz, mientras que en soja es lisa. Debajo se encuentra un mesófilo heterogéneo con estructura dorsiventral, que incluye el parénquima en empalizada que es mayoritariamente biestratificado, formado por células cilíndricas y alargadas con espacios intercelulares pequeños. Entre el parénquima en empalizada y el lagunar se encuentran los haces vasculares. El parénquima lagunar está formado por células con forma estrellada y con abundantes espacios intercelulares. Por último, se encuentra la epidermis inferior, cuya estructura, tamaño y forma celular es similar a la de la epidermis adaxial. Los estomas están localizados en ambas epidermis, pero mayoritariamente en la abaxial. En el envés de las hojas de altramuz se observan tricomas unicelulares, con pared secundaria lignificada y con cutícula esculturada. En las hojas de soja, aparecen tricomas pluricelulares o peltados, con cutícula lisa.

Las hojas de altramuz sometidas a 24 μM Cu también presentan una buena organización estructural. Si bien, el exceso de Cu ha reducido el espesor de las hojas, debido a que las células de los parénquimas en empalizada y lagunar son más cortas y estrechas. También se observa que existe un mayor grado de compactación entre las células de ambos tejidos, con menos espacios intercelulares entre ellas. Esto último, se observa más claramente en el parénquima lagunar que en el de empalizada (Figs. 2B-2D).

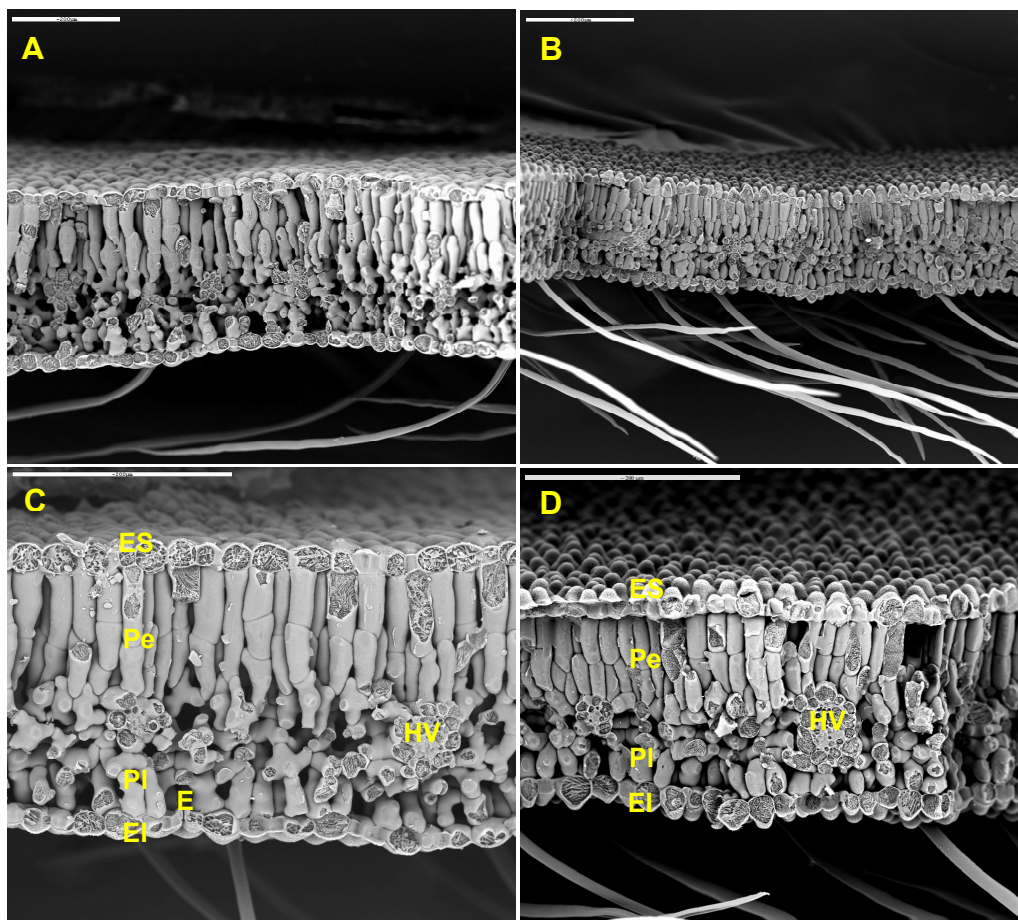


Fig. 2. Microfotografías de secciones de hojas de altramus obtenidas mediante LTSEM: 1,6 μM Cu (A y C); 24 μM Cu (B y D). E: estoma; El: epidermis inferior; ES: epidermis superior; HV: haz vascular; Pe: parénquima empalizada; Pl: parénquima lagunar

En soja, el exceso de Cu provoca una ligera disminución del espesor de la hoja y del tamaño de las células del parénquima en empalizada, sin embargo, no afecta al grado de compactación entre ellas. El tamaño de las células del parénquima lagunar parece no estar afectado por el exceso de Cu, aunque en este tejido hay más espacios intercelulares (Fig. 3B). En las áreas necróticas de las hojas se puede observar una pérdida de la estructura, no se distinguen ninguno de los dos parénquimas, ni los haces vasculares y las células carecen de contenido celular (Fig. 3D). Además se ven restos de estructuras celulares y gránulos de almidón (Fig. 3F).

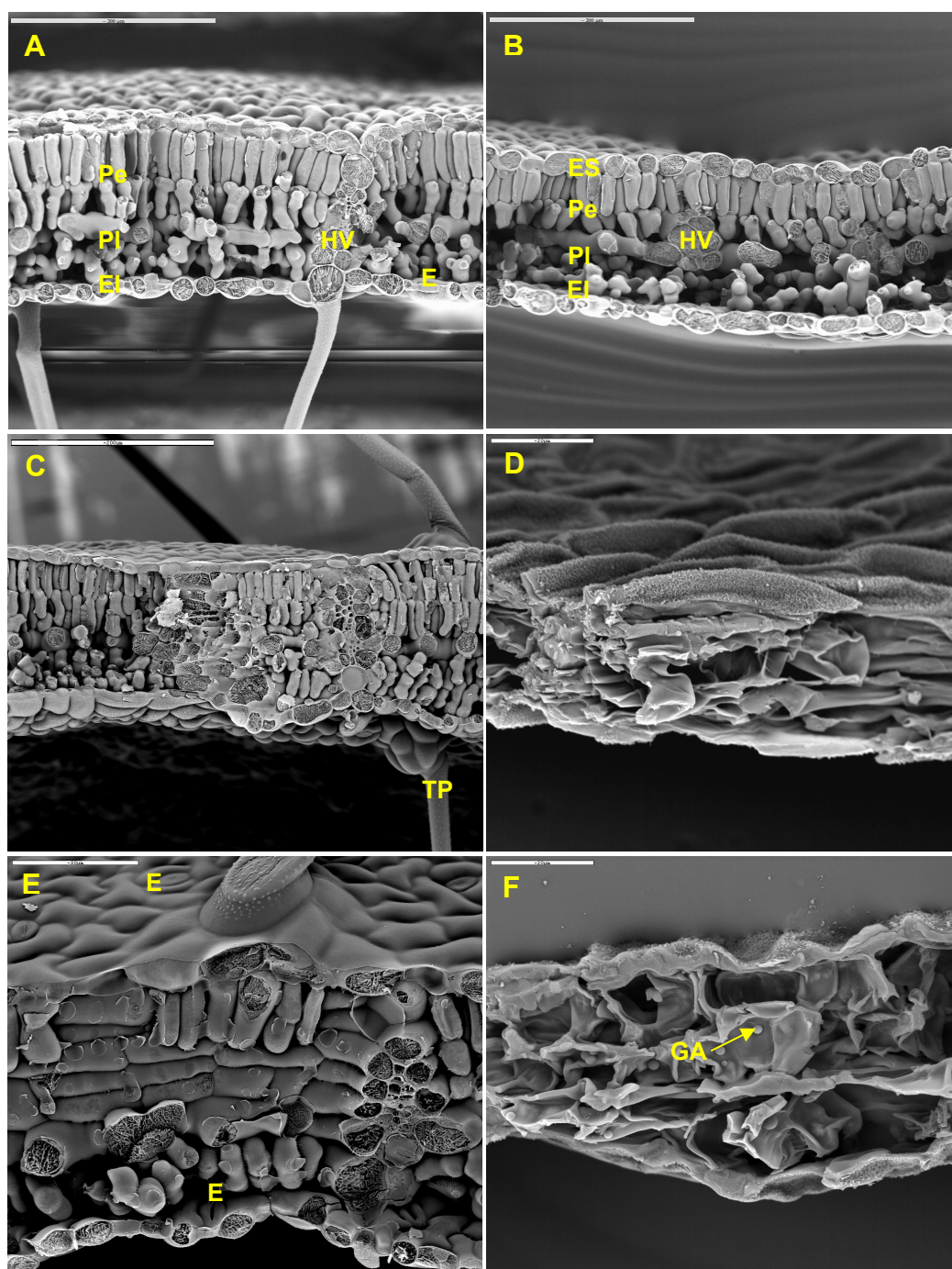


Fig. 3. Microfotografías de secciones de hojas de soja obtenidas mediante LTSEM: 1,6 μ M Cu (A, C y E); 24 μ M Cu (B); 24 μ M Cu - necrosis (D y F). E: estoma; El: epidermis inferior; ES: epidermis superior; GA: gránulos de almidón; HV: haz vascular; Pe: parénquima empalizada; Pl: parénquima lagunar; TP: tricoma peltado

1.3. Índices fisiológicos foliares

Los resultados de diversos parámetros fisiológicos calculados en las hojas de las plantas cultivadas con 1,6 y 24 μM Cu se muestran en la [Tabla 1](#) y en la [Fig. 4](#). Los índices calculados son la tasa de asimilación neta (NAR), el índice de capacidad fotosintética (ICF), la concentración de clorofilas y carotenoides totales, así como los porcentajes de actividad fotosintética. En comparación al tratamiento control, el NAR y el ICF en las hojas de altramuz tratadas con 24 μM Cu se reducen un 27% y 36%, respectivamente. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en la concentración de clorofila *a* ni en la de carotenoides, pero aumenta un 18% la de clorofila *b* ([Tabla 1](#)). Asimismo, el exceso de Cu no promueve ninguna variación significativa en el % de área verde o fotosintéticamente activa, ni en el % de área roja, aunque se multiplica casi por diez el % de área amarilla que corresponde a zonas cloróticas ([Fig. 4](#)). En comparación a los valores de las plantas control, las hojas de soja tratadas con 24 μM Cu ([Tabla 1](#)), presentan reducciones del NAR (43%), ICF (77%), concentración de carotenoides (21%) y de clorofilas *a* y *b* (53%). El % de área fotosintéticamente activa (verde) también experimenta una disminución por efecto del exceso de Cu, mientras que se multiplican por 11 y por 7 los % de área amarilla y roja, respectivamente ([Fig. 5](#)).

Tabla 1. Índices fisiológicos en las hojas de plantas de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). La significación de las medias para dosis de Cu y especie vegetal se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Índices fisiológicos	Dosis Cu (μM)			
	1,6	24	1,6	24
	<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
NAR ($\text{g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$)	$2,90 \pm 0,15^a$	$2,12 \pm 0,64^b$	$5,53 \pm 0,33^a$	$3,16 \pm 0,11^b$
ICF	$458,43 \pm 41,14^a$	$294,13 \pm 22,57^b$	$2379,0 \pm 79,1^a$	$538,2 \pm 88,0^b$
Clorofila <i>a</i> (mg g^{-1} MF)	$1,14 \pm 0,04^a$	$1,22 \pm 0,04^a$	$1,58 \pm 0,04^a$	$0,73 \pm 0,03^b$
Clorofila <i>b</i> (mg g^{-1} MF)	$0,28 \pm 0,01^a$	$0,33 \pm 0,01^b$	$0,42 \pm 0,01^a$	$0,20 \pm 0,01^b$
Carotenoides (mg g^{-1} MF)	$0,165 \pm 0,003^a$	$0,162 \pm 0,004^a$	$0,130 \pm 0,001^a$	$0,103 \pm 0,002^b$

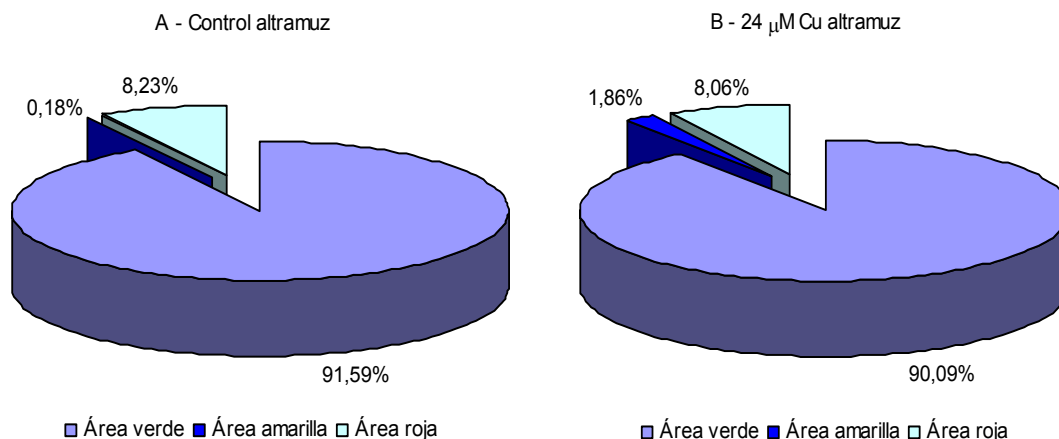


Fig. 4. Porcentajes de actividad fotosintética en hojas de altramus tratadas durante 35 días con 1,6 μ M (A) y 24 μ M de Cu (B)

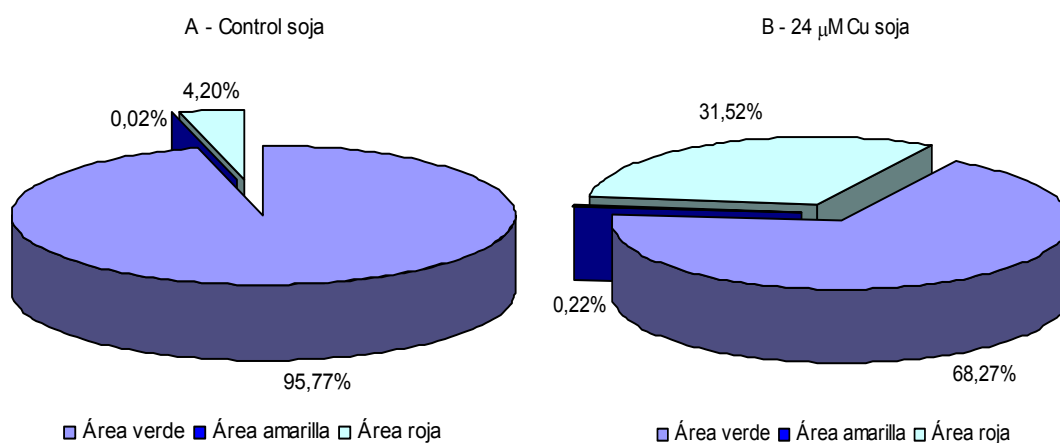


Fig. 5. Porcentajes de actividad fotosintética en hojas de soja tratadas durante 35 días con 1,6 μ M (A) y 24 μ M de Cu (B)

1.4. Índices morfológicos de desarrollo radicular

Para evaluar el efecto del exceso de Cu sobre las raíces de plantas de *altramus* y *soja* cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu, se han calculado varios índices morfológicos relacionados con el desarrollo radicular como son el radio (r_0), el área radicular (RA), longitud (LR), así como, la proporción de peso seco localizado en las raíces (RMR). En *altramus* (Fig. 6), se observa que el suministro de 24 μ M Cu reduce de forma

significativa el r_0 (26%) y el RA (30%); aumenta el RMR y no altera la longitud de la raíz (LR). En soja, el aporte de 24 μM Cu también disminuye de forma significativa el r_0 (52%) y el RA (32%), pero incrementa el índice RGR (28%) y no afecta al RMR. El aspecto que presentan las raíces de ambas especies vegetales tratadas con 1,6 y 24 μM de Cu se muestra en la Fig. 7.

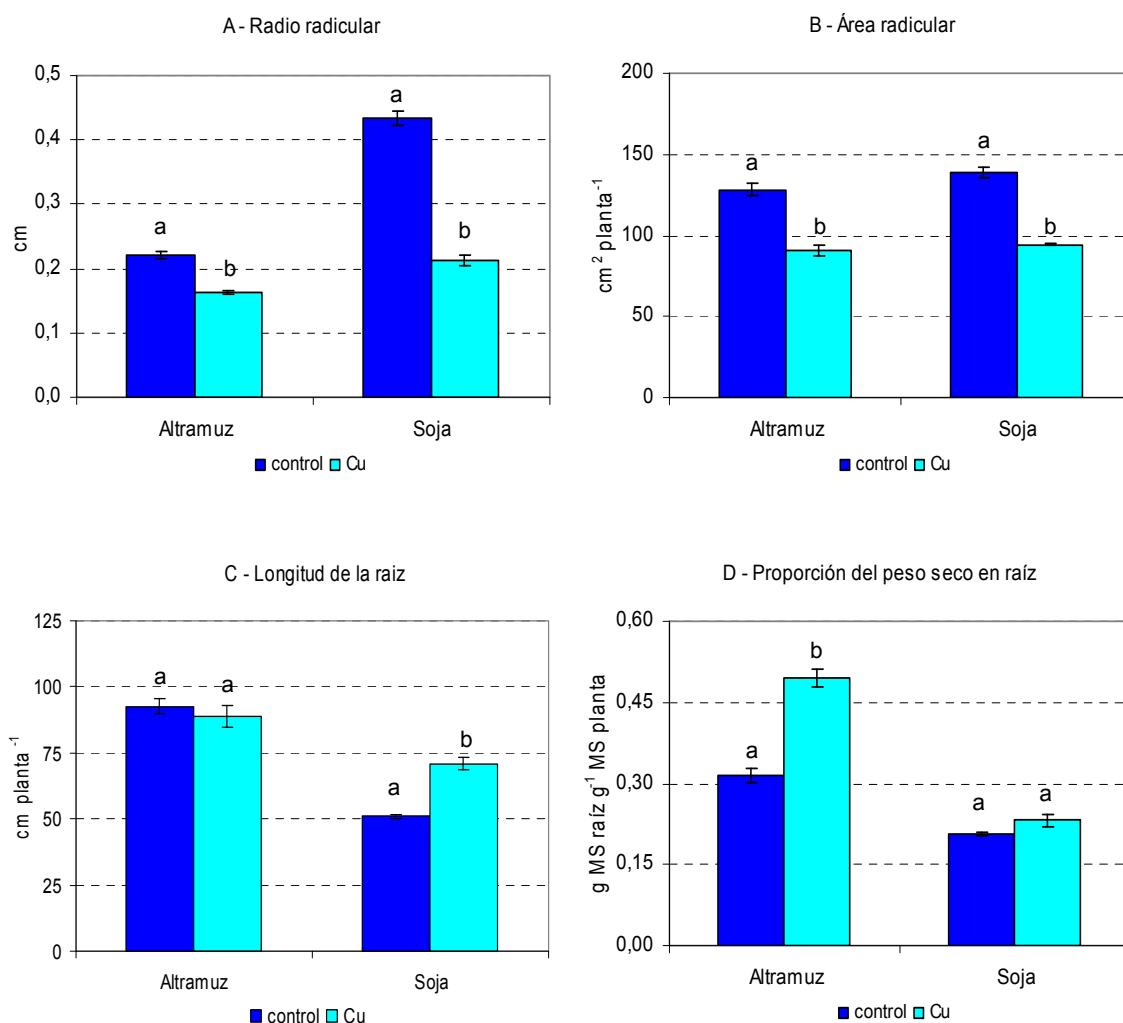


Fig. 6. Índices de desarrollo radicular de plantas de altramuz y soja tratadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Radio radicular (A), área radicular (B), longitud de la raíz (C) y proporción de peso seco en raíz (D). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para cada dosis de Cu se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)



Fig. 7. Aspecto de las raíces de altramuz y soja cultivadas durante 35 días con 1,6 μM (control) y 24 μM de Cu

1.5. Estructura de la raíz

El efecto del exceso de Cu sobre la ultraestructura de las raíces de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu se observó mediante el empleo de LTSEM. Las microfotografías obtenidas para los dos cultivos se muestran en las Figs. 8 y 9. Las raíces de ambas leguminosas cultivadas con 1,6 μM Cu presentan una estructura bien organizada, la cual está constituida tres zonas claramente diferenciadas: la rizodermis, el córtex y el cilindro central. La rizodermis está formada por una fina capa de células. En soja aparece recubierta por una capa de súber. Hacia el interior se puede observar el córtex con una estructura homogénea. En altramuz, el córtex externo está constituido por capas de células de gran tamaño, mientras que en el interno disminuye el tamaño celular. En esta especie vegetal, la disposición de las células es radial, con espacios intercelulares triangulares. En soja, tanto el córtex externo como el interno están constituidos por células grandes con abundantes espacios intercelulares de forma tetragonal. El cilindro central o estela comprende el sistema vascular y el parénquima asociado. Este último formado por células de paredes delgadas, alargadas y más pequeñas que las del córtex interno (Figs. 8A y

9A). En altramuza, la estela es de mayor diámetro que en soja y la médula presenta espacios intercelulares, mientras que en soja no se observan casi espacios entre las células (Figs. 8A y 9A).

Fundamentalmente en ambas especies, la dosis más alta de Cu parece que altera la disposición de las células de la rizodermis (Figs. 8B y 9D). En la raíz de soja tratada con 24 μM Cu, además se observa un engrosamiento del súber que rodea a la rizodermis, y algunas de las células parenquimatosas del córtex externo muestran una plasmolisis incipiente.

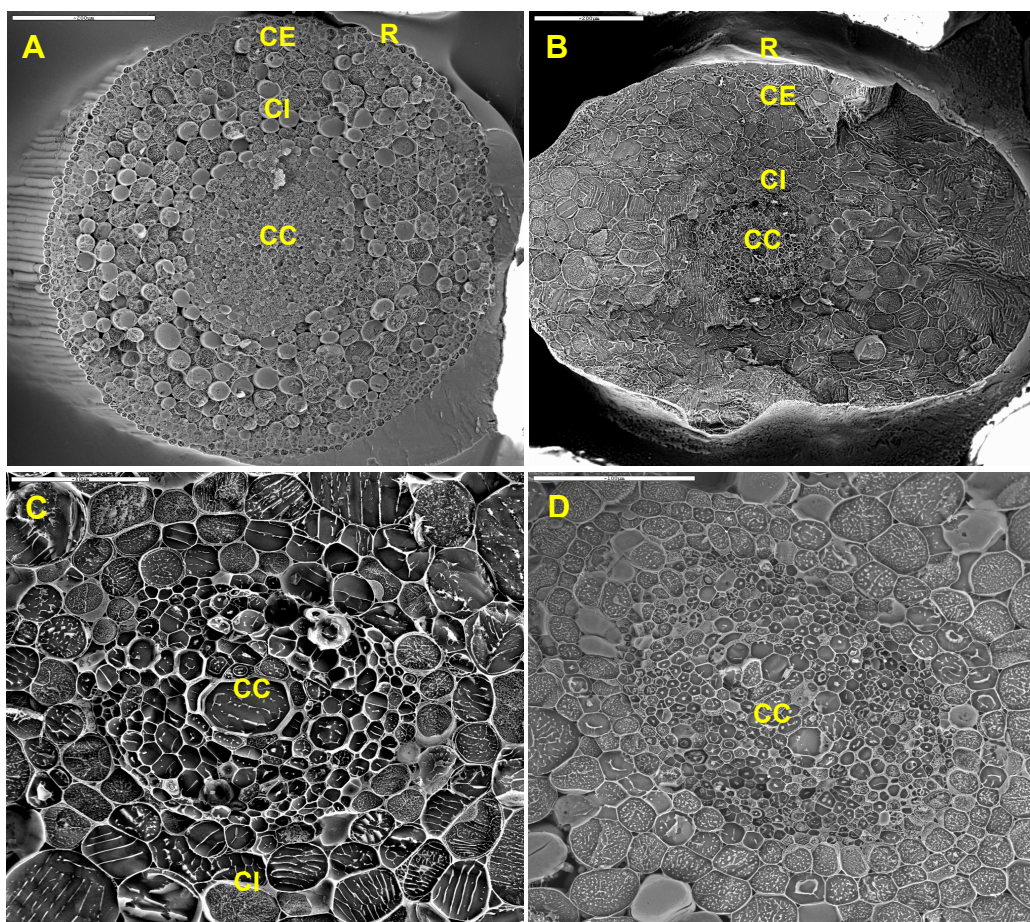


Fig. 8. Microfotografías de secciones de raíces de altramuza obtenidas mediante LTSEM: control (A y C); 24 μM Cu (B y D). CC: cilindro central; CE: córtex externo; CI: córtex interno; R: rizodermis

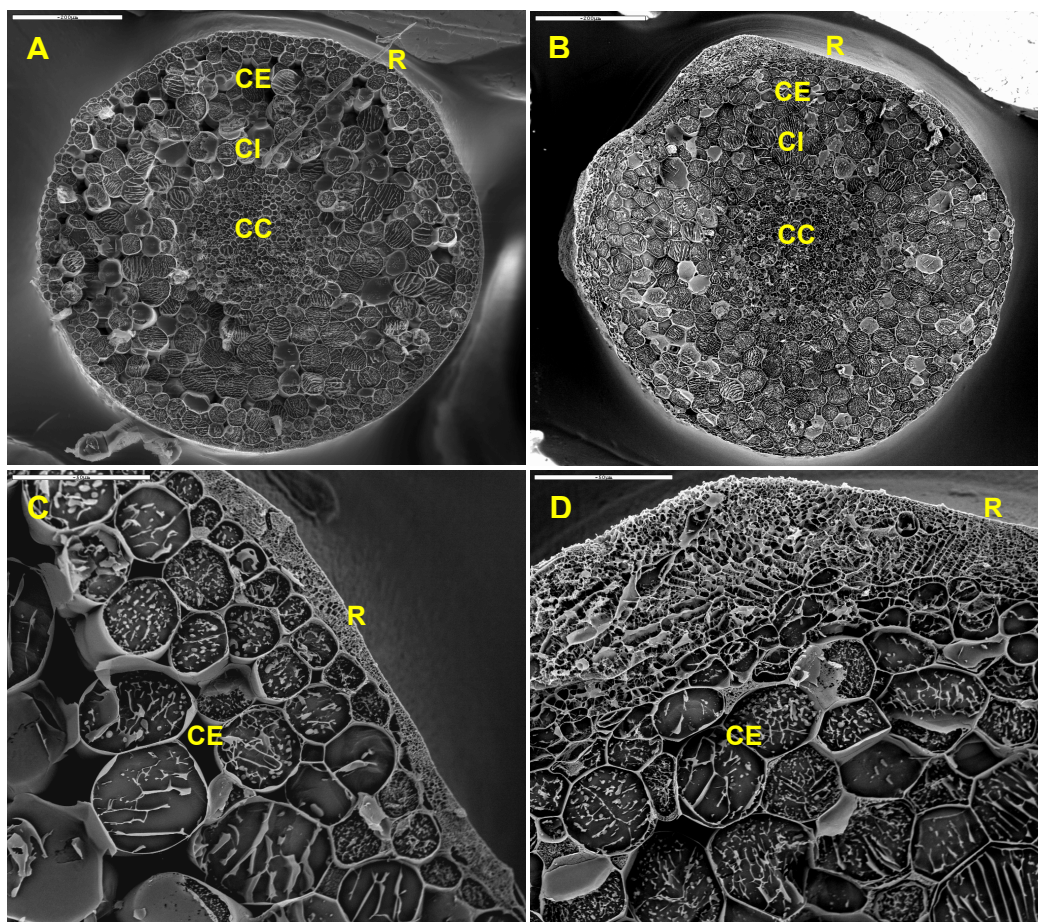


Fig. 9. Microfotografías de secciones de raíces de soja obtenidas mediante LTSEM: control (A y C); 24 μ M Cu (B y D). CC: cilindro central; CE: cortex externo; CI: cortex interno; R: rizodermis

1.6. Efecto del exceso de Cu sobre la concentración de nutrientes

Los resultados de la concentración de P, K, Ca y Mg en hojas, tallos y raíces de plantas de altramuza y soja sometidas a 1,6 y 24 μ M de Cu, se recogen en la [Tabla 2](#). Al aumentar la dosis de Cu disminuye de forma significativa la concentración de P y K en todos los órganos de la planta de altramuza, los porcentajes de reducción se encuentran comprendidos entre un 13-16%. Asimismo, desciende significativamente la concentración de Ca y Mg en los tallos y en la raíz de esta leguminosa; los % de reducción son más elevados para el Mg (14%-16%) que para el Ca (9%-10%). En las hojas, la concentración de estos nutrientes no varía.

El aporte de 24 μ M Cu en soja reduce un 23% y un 16% la concentración de P en hojas y tallos, respectivamente, mientras que no altera la de la raíz. En cuanto a la

concentración de K, Ca y Mg en los distintos órganos analizados, no experimentan ninguna variación por efecto de las dosis de Cu aportadas.

Tabla 2. Concentración de P, K, Ca y Mg (g kg^{-1} MS) en hojas, tallos y raíz de plantas de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). La significación de las medias para cada dosis de Cu se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Macronutrientes		Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
P	Hojas	12,85 \pm 0,13 ^a	10,92 \pm 0,30 ^b	9,37 \pm 0,11 ^a	7,26 \pm 0,30 ^b
	Tallos	8,69 \pm 0,05 ^a	7,29 \pm 0,22 ^b	6,96 \pm 0,10 ^a	5,85 \pm 0,37 ^b
	Raíz	13,46 \pm 0,20 ^a	11,75 \pm 0,05 ^b	16,22 \pm 0,65 ^a	14,96 \pm 0,21 ^a
K	Hojas	46,28 \pm 0,08 ^a	40,31 \pm 0,54 ^b	52,75 \pm 0,44 ^a	54,27 \pm 1,13 ^a
	Tallos	51,59 \pm 0,13 ^a	43,28 \pm 0,87 ^b	38,54 \pm 0,89 ^a	40,43 \pm 1,36 ^a
	Raíz	52,50 \pm 0,39 ^a	48,82 \pm 0,41 ^b	45,96 \pm 0,84 ^a	46,72 \pm 0,54 ^a
Ca	Hojas	12,29 \pm 0,21 ^a	13,52 \pm 0,29 ^a	23,09 \pm 0,77 ^a	20,44 \pm 1,12 ^a
	Tallos	9,79 \pm 0,10 ^a	8,82 \pm 0,05 ^b	12,73 \pm 0,76 ^a	11,42 \pm 1,01 ^a
	Raíz	8,38 \pm 0,18 ^a	7,64 \pm 0,14 ^b	10,75 \pm 0,55 ^a	10,32 \pm 0,29 ^a
Mg	Hojas	4,04 \pm 0,03 ^a	3,98 \pm 0,07 ^a	2,39 \pm 0,05 ^a	2,21 \pm 0,07 ^a
	Tallos	2,08 \pm 0,01 ^a	1,73 \pm 0,04 ^b	2,90 \pm 0,05 ^a	3,68 \pm 0,24 ^b
	Raíz	2,52 \pm 0,06 ^a	2,15 \pm 0,06 ^b	5,10 \pm 0,01 ^a	5,43 \pm 0,12 ^a

Por otro lado, las concentraciones de Cu, Fe, Mn, Zn y Ni en las hojas, tallos y raíces de plantas de altramuz y soja tratadas con 1,6 y 24 μM Cu, se muestran en la **Tabla 3**. En ambos cultivos, la concentración de Cu aumenta en todos los órganos de la planta a medida que lo hace la dosis aportada. En las hojas de altramuz, el exceso de Cu (24 μM) provoca un descenso de Fe (53%) y Ni (35%) y un aumento de Zn (24%) en comparación a los valores del tratamiento control. La concentración de Mn en hojas no varía. En tallos, no se observan diferencias significativas entre las dos dosis de Cu. El suministro de 24 μM Cu a altramuz no modifica la concentración de Fe ni la de Mn; sin embargo, causa un descenso de Zn (38%) y Ni (19%).

En las hojas de soja, la concentración de Fe y Ni disminuye de forma significativa un 66% y 44%, respectivamente, con la dosis más alta de Cu. Por el contrario, aumenta la de Mn (39%) y Zn (17%). Algo similar se observa en los tallos de esta leguminosa, si bien, la concentración de Ni no varía. En raíz, el aporte de 24 μM de Cu aumenta la concentración de Fe (90%), Mn (30%) y Zn (95%), respecto a los valores que muestran las plantas de soja procedentes del tratamiento control.

Tabla 3. Concentración de Cu, Fe, Mn, Zn y Ni (mg kg^{-1} MS) en hojas, tallos y raíz de plantas de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$)

Micronutrientes		Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
Cu	Hojas	3,40 \pm 0,22 ^a	34,96 \pm 1,24 ^b	6,05 \pm 0,19 ^a	20,86 \pm 1,26 ^b
	Tallos	2,48 \pm 0,22 ^a	11,04 \pm 0,06 ^b	5,08 \pm 0,33 ^a	20,95 \pm 0,72 ^b
	Raíz	14,88 \pm 0,54 ^a	443,85 \pm 17,30 ^b	24,02 \pm 1,82 ^a	758,06 \pm 18,67 ^b
Fe	Hojas	61,26 \pm 3,32 ^a	28,81 \pm 2,28 ^b	74,32 \pm 1,85 ^a	25,19 \pm 1,14 ^b
	Tallos	17,98 \pm 1,71 ^a	17,72 \pm 0,38 ^a	27,39 \pm 0,90 ^a	17,97 \pm 0,87 ^b
	Raíz	1323,8 \pm 170,2 ^a	1276,3 \pm 16,0 ^a	597,4 \pm 40,4 ^a	1136,4 \pm 64,7 ^b
Mn	Hojas	1485,7 \pm 141,3 ^a	1772,3 \pm 106,7 ^a	486,4 \pm 11,7 ^a	676,6 \pm 19,1 ^b
	Tallos	271,3 \pm 19,0 ^a	276,4 \pm 21,7 ^a	99,5 \pm 1,9 ^a	458,4 \pm 4,2 ^b
	Raíz	152,5 \pm 6,8 ^a	183,6 \pm 13,9 ^a	1183,3 \pm 14,6 ^a	1537,5 \pm 79,9 ^b
Zn	Hojas	56,70 \pm 2,81 ^a	70,14 \pm 1,71 ^b	81,61 \pm 1,14 ^a	95,11 \pm 1,90 ^b
	Tallos	243,3 \pm 12,1 ^a	274,0 \pm 14,2 ^a	32,85 \pm 0,76 ^a	60,53 \pm 2,67 ^b
	Raíz	182,0 \pm 6,4 ^a	113,3 \pm 4,5 ^b	43,63 \pm 1,63 ^a	84,98 \pm 3,75 ^b
Ni	Hojas	4,77 \pm 0,29 ^a	3,10 \pm 0,19 ^b	0,55 \pm 0,04 ^a	0,31 \pm 0,08 ^b
	Tallos	2,83 \pm 0,04 ^a	2,62 \pm 0,11 ^a	0,25 \pm 0,02 ^a	0,23 \pm 0,05 ^a
	Raíz	3,38 \pm 0,16 ^a	2,75 \pm 0,17 ^b	nd	nd

nd: no detectado

2.- Discusión de las alteraciones morfológicas, estructurales y fisiológicas producidas por el exceso de Cu

El Cu es un nutriente esencial para las plantas, pero niveles elevados de este metal pueden provocar desórdenes morfológicos, fisiológicos y estructurales, y como consecuencia, reducir el crecimiento vegetal ([Kabata-Pendias y Pendias, 2000](#); [Prasad, 2004](#)). El efecto inhibitor del exceso de Cu sobre el crecimiento de las plantas, ha sido ampliamente estudiado en diversas especies vegetales, como se ha comentado en capítulos anteriores. Sin embargo, la utilización de aproximaciones matemáticas para analizar cuantitativamente el crecimiento vegetal bajo situaciones de estrés por MP ha sido realizada en contadas ocasiones ([Vassilev y Yordanov, 1997](#)). Esta metodología se ha mostrado muy útil para evaluar la incidencia de factores tales como, luz, temperatura, CO₂, disponibilidad de H₂O y nutrientes, etc., que cuando son limitantes, afectan de una forma negativa al desarrollo de las plantas.

En muchas ocasiones, la fitotoxicidad de un elemento traza se evalúa analizando únicamente una parte de la planta. Pero para realizar una buena aproximación sobre las causas que limitan el crecimiento vegetal, se debe realizar el análisis en el total de la planta, ya que éste es un proceso fisiológico integral con un elevado grado de organización y regulación, comparada con otros procesos individuales. Algunos índices que se utilizan con frecuencia en el análisis cuantitativo del crecimiento incluyen, la tasa de crecimiento relativo (RGR) que es un índice integral, que depende de dos componentes básicos como son la proporción de área de las hojas (LAR) y la tasa de asimilación neta (NAR). Los cuales son, respectivamente, componentes morfológicos y fisiológicos del RGR ([Villar y col., 2004](#)). El LAR a su vez depende de la proporción del peso foliar al total de la planta (LMR) y del área foliar específica (SLA), mientras que el NAR depende de la tasa fotosintética, del ritmo de respiración celular y también de la proporción relativa de los órganos no fotosintéticos al total de la planta ([Villar y col., 2004](#)).

En plantas de trigo (Abo-Kassen y col., 1991), remolacha (Greger y col., 1991) y cebada (Vassilev y col., 1998) tratadas con Cd se ha observado una disminución del RGR, debido, principalmente, a una reducción del NAR más que a una caída en el LAR. Di Baccio y col. (2009) encuentran algo similar en *Populus × euramericana* al suministrar dosis elevadas de Zn. La inhibición del RGR por efecto de dosis elevadas de Cu también ha sido observada en otras especies de *Populus* (Borghi y col., 2007; Borghi y col., 2008) y en cebada (Vassilev y col., 1998). En este trabajo, el suministro de 24 μM de Cu reduce, casi en la misma cuantía, la tasa de crecimiento relativo de ambas leguminosas (Fig. 10), lo cual podría ser atribuido a una disminución del NAR más que a variaciones en el índice LAR, siendo este hecho mucho más intenso en soja que en altramuz (Tabla 1; Fig. 1C). Con independencia de la dosis de Cu, los valores de RGR estimados en la planta de altramuz son un ligeramente mayores que los de soja. Esto podría ser debido tanto a diferencias morfológicas como fisiológicas (Villar y col., 2004), ya que se ha observado en altramuz una mayor proporción del área foliar (LAR) y una menor tasa de asimilación neta (NAR) que en soja.

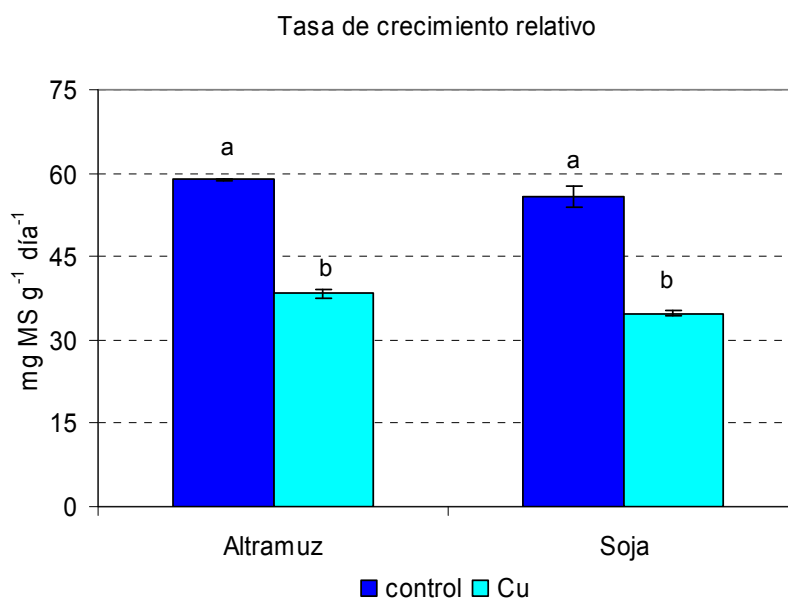


Fig. 10. Tasa de crecimiento relativo total (RGR) en plantas de altramuz y soja tratadas durante 35 días con 1,6 μM (control) y 24 μM de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para cada dosis de Cu se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Con respecto a los índices LMR y SLA, en soja se ven poco afectados por el exceso de Cu, mientras que en altramuz descende el primero y aumenta el segundo (Figs. 1E-1F). En *Populus x canadensis* sometidas durante 30 días a 75 μ M Cu, no varió el índice SLA, pero disminuyó en *Populus alba*. Según Borghi y col. (2008), este parámetro se reduce al aumentar el tiempo de exposición a niveles elevados de Cu.

Además cabe destacar que ambas leguminosas tienen las hojas compuestas, pero en el caso del altramuz, cada hoja está formada por siete folíolos, mientras que las de soja está compuestas por tres; presentando las plantas control de esta última leguminosa una mayor área foliar pero un menor número de hojas. El exceso de Cu ha afectado de forma negativa al área total (LA) y el número de hojas en ambos cultivos; si bien, los descensos han sido más acusados en altramuz que en soja (Figs. 1A-1B). Niveles elevados de Cu provocan resultados similares en orégano (Panou-Filotheou y col., 2001), pepino (Alaoui-Sossé y col., 2004), álamos (Borghi y col., 2007 y 2008) y trigo (Cook y col., 1997). Pero también se encuentran efectos similares en plantas de cebada tratadas con Cd (Vassilev y col., 1998) y en álamos crecidos con dosis elevadas de Zn (Di Baccio y col., 2009).

A su vez en este trabajo se han detectado alteraciones en el espesor de las hojas de altramuz pero no en las de soja, llegándose a reducir casi a la mitad en la primera especie mencionada (Fig. 1D). Esto coincide con lo observado a nivel ultraestructural mediante LTSEM, ya que el mesófilo de las hojas de altramuz tratadas con 24 μ M de Cu presenta un menor espesor que el de las cultivadas con una dosis normal de Cu (Fig. 2). En las hojas de soja, las alteraciones a nivel ultraestructural que provoca el exceso de Cu son menos ostensibles (Fig. 3). Otros autores (Panou-Filotheou y col., 2001) detectaron un aumento del grosor de las hojas de orégano sometidas a toxicidad de Cu. Algo similar se observó en *Populus x euramericana* al cultivarlas con 10 mM de Zn (Di Baccio y col., 2009).

Otros cambios significativos se han observado a nivel ultraestructural al comparar las hojas de las plantas control y las tratadas con 24 μ M de Cu. Fundamentalmente, destacan la reducción del tamaño de las células del mesófilo y la

disminución de los espacios intercelulares (Fig. 2). En cambio en soja, es destacable el descenso del volumen de las células del parénquima en empalizada y el incremento de los espacios intercelulares en el parénquima lagunar; llegando a presentar las hojas necróticas una estructura celular totalmente desorganizada (Fig. 3).

Según algunos autores (Kabata-Pendias y Pendias, 2000; Panou-Filotheou y Bosabalidis, 2004), el exceso de Cu inhibe la elongación y la división celular. Este primer proceso es complejo y depende del potencial de presión, de la síntesis de los componentes de la pared celular, así como de los procesos reguladores del crecimiento (Ouzounidou y col., 1995). Kasim (2005) observó una disminución de las dimensiones de las células foliares en plantas de haba sometidas a toxicidad de Cu. Lo cual atribuyó a una reducción de la elasticidad de la pared celular, provocada por una inhibición irreversible de las proteínas que regulan dicho proceso. También se ha detectado un descenso del tamaño y número de células del mesófilo en hojas de mostaza tratadas con Hg (Shiyab y col., 2009), Zn (Sridhar y col., 2005) y en frondes de helechos sometidos a estrés por Cr (Su y col., 2005). En cambio, Panou-Filotheou y col. (2001) observaron el efecto contrario en las células del parénquima lagunar de hojas de orégano cultivadas con un exceso de Cu. Además, detectaron una disminución de los espacios intercelulares en el mesófilo, y por tanto, una menor difusión del agua a través de la hoja. Sin embargo, en *Thlaspi* concentraciones tóxicas de Cu no afectan de forma significativa al volumen de los espacios intercelulares (Ouzounidou y col., 1992). El suministro de Cd (Barceló y col., 1988) y Cr (Vázquez y col., 1987) reduce el tamaño de los espacios intercelulares en hojas de judía. La reducción del número de células podría ser debido a una menor velocidad de crecimiento ocasionada por la acumulación de estos metales en la planta (Shiyab y col., 2009).

El exceso de Cu también puede alterar determinados procesos fisiológicos entre los que se encuentra la actividad fotosintética. En este experimento se han determinado una serie de parámetros para evaluar la eficiencia fotosintética (Tabla 1, Figs. 4 y 5). De su análisis se deduce que dosis altas de Cu afectan con mayor

intensidad a la actividad fotosintética de soja que a la de altramuza, ya que en esta última especie se ven pocos cambios en los pigmentos analizados y en el porcentaje de área verde. En las hojas de soja, el exceso de Cu reduce el contenido de clorofilas y carotenoides y exalta el porcentaje de área clorótica y necrótica. Lo cual podría ser debido a una disminución de la biosíntesis de clorofilas, causado por la destrucción de la estructura interna del cloroplasto y por daños en las membranas tilacoidales como sugieren ciertos autores ([Maksymiec, 1997](#); [Quartacci y col., 2000](#)). Bajos contenidos de clorofilas, alteraciones ultraestructurales en los cloroplastos, variaciones en la composición de las membranas tilacoidales e inhibición de la actividad fotosintética se han observado en hojas de diversas especies en condiciones de toxicidad de Cu ([Barón y col., 1995](#); [Yruela, 2005](#)). Sin embargo, el efecto contrario se ha detectado en plantas tolerantes al Cu ([Stiborova y col., 1986](#); [Borghi y col., 2008](#)).

Con respecto a la raíz, al estar este órgano en contacto directo con niveles elevados de Cu, va a ser el primero en desarrollar una serie de síntomas en respuesta a la toxicidad del MP ([Kabata-Pendias y Pendias, 2000](#); [Prasad, 2004](#)). En ambas leguminosas, el aporte de 24 μM de Cu altera principalmente al radio y área radicular ([Figs. 6A-6B](#)); siendo este hecho más acusado en la raíz de soja que en la de altramuza. Aunque hay que destacar que la de soja muestra, con independencia de la dosis de Cu, un mayor radio y área radicular que la de altramuza, pero una menor longitud y tasa de crecimiento relativo. Otros autores han encontrado severas reducciones de la longitud y el volumen de las raíces en *Arabidopsis thaliana* ([Lequeux y col., 2010](#)), maíz ([Ouzounidou y col., 1994](#)) y orégano ([Panou-Filothou y Bosabalidis, 2004](#)) al cultivarlas con dosis altas de Cu. Como se ha comentado anteriormente, esto podría estar provocado por una inhibición de la elongación y la división celular, ya que el Cu puede afectar negativamente a la organización del huso mitótico y otras fases de la mitosis ([Panou-Filothou y Bosabalidis, 2004](#)). Según [Raven y col. \(1999\)](#), la reducción de estos procesos podría estar causada por el efecto inhibitorio que ejerce el Cu sobre la biosíntesis y el transporte de auxinas y giberelinas, ambas responsables de la elongación celular, así como en los mecanismos de control de las citoquininas que participan en los procesos de división celular.

El suministro de 24 μM Cu ha afectado a la disposición de las células de la rizodermis (Figs. 8 y 9) fundamentalmente en soja, ya que se observa un fuerte engrosamiento del súber que rodea a la rizodermis (Figs. 9C-9D). Estos resultados eran de esperar ya que este tejido hace de “frontera”, y por tanto, está en contacto directo con el metal. Panou-Filothéou y Bosabalidis (2004) observaron un deterioro de la rizodermis en raíces de orégano tratadas con niveles elevados de Cu.

Por otro lado, parece que las raíces de altramuz cultivadas con 24 μM Cu presentan un ligero aumento del tamaño de las células corticales, mientras que en soja se observa lo contrario (Figs. 8 y 9). Un incremento de las dimensiones de las células parenquimáticas del córtex observaron Panou-Filothéou y Bosabalidis (2004), en raíces de orégano tratadas con Cu y en habas cultivadas con Cd (Vázquez y col., 1992). Según Panou-Filothéou y Bosabalidis (2004), en estas células se estaría produciendo un mayor almacenamiento de agua; lo cual podría actuar como un mecanismo de defensa de las plantas frente al estrés por MP. En otros casos, dosis altas de Cu causan un descenso del tamaño de las células de la raíz en plantas de habas y sorgo (Kasim 2005; 2006).

Por otro lado, el estrés de Cu puede ocasionar desequilibrios nutricionales en las plantas, como se ha comentado en el capítulo anterior. En este estudio, el exceso de Cu disminuye la concentración de P, K, Ca y Mg en raíz de altramuz, pero apenas modifica la de soja. En hojas, sólo reduce la concentración de P y K en altramuz y la del primer elemento en soja. Por lo tanto, parece que el aporte de 24 μM Cu afecta más a la absorción de estos nutrientes que a su transporte a la parte aérea de la planta. Lequeux y col. (2010) encuentran descensos en el contenido de S y K en raíz y de K, Ca, P, Fe y Mn en hojas de *Arabidopsis thaliana* crecidas con dosis elevadas de Cu. Del mismo modo, Ouzounidou y col. (1998) observan reducciones en la concentración de Fe, Na, K, Ca y Mg en hojas de espinaca. Sin embargo, el estrés por Cu no produce variaciones en la concentración de K, Ca y Mg en raíces de pepino, pero los reduce en hojas (Alaoui-Sossé y col., 2004).



Capítulo V

1.- Resultados de fraccionamiento y localización subcelular de nutrientes en plantas de altramuz y soja

1.1. Concentración y distribución subcelular de Cu

La concentración de Cu en las distintas fracciones subcelulares de hojas superiores (HS), inferiores (HI) y raíces de plantas de altramuz y soja sometidas a 1,6 y 24 μM de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), se muestra en las Figs. 1 y 2, respectivamente. Los valores correspondientes a los cloroplastos en las hojas y leucoplastos en las raíces, membranas y otros orgánulos se han considerado como una única fracción a la que se ha denominado, orgánulos. Se puede observar, como al aumentar la dosis de Cu en el medio de cultivo, también lo hace la concentración del metal en todas las fracciones y órganos de la planta de altramuz (Fig. 1). En comparación a los valores del tratamiento control (1,6 μM Cu), en las hojas, tanto superiores como inferiores de las plantas tratadas con 24 μM Cu, los incrementos de Cu en las distintas fracciones son casi del mismo orden. La fracción soluble es la que más aumenta en las hojas (15 veces) seguida de la pared (5 veces) y los orgánulos (3 veces). En raíz, la concentración de Cu aumenta en orgánulos aproximadamente 50 veces con respecto al control, mientras que en la pared celular y en la fracción soluble, los incrementos observados son casi de 30 veces.

En soja, también se observa un aumento significativo de la concentración de Cu en todas las fracciones y órganos de las plantas tratadas con 24 μM Cu (Fig. 2). En las HS el aumento es mayor en los orgánulos (12,3 veces), seguida de la fracción soluble (6,8 veces) y de la pared celular (5,2 veces). En las HI, los incrementos en la fracción soluble y en los orgánulos son aproximadamente del mismo orden (5 veces), mientras que en la pared celular se multiplica por 3,6. En raíz, aumenta considerablemente el Cu localizado en los orgánulos (84 veces), mientras que en la pared celular y fracción soluble se multiplica por 50 y 17, respectivamente.

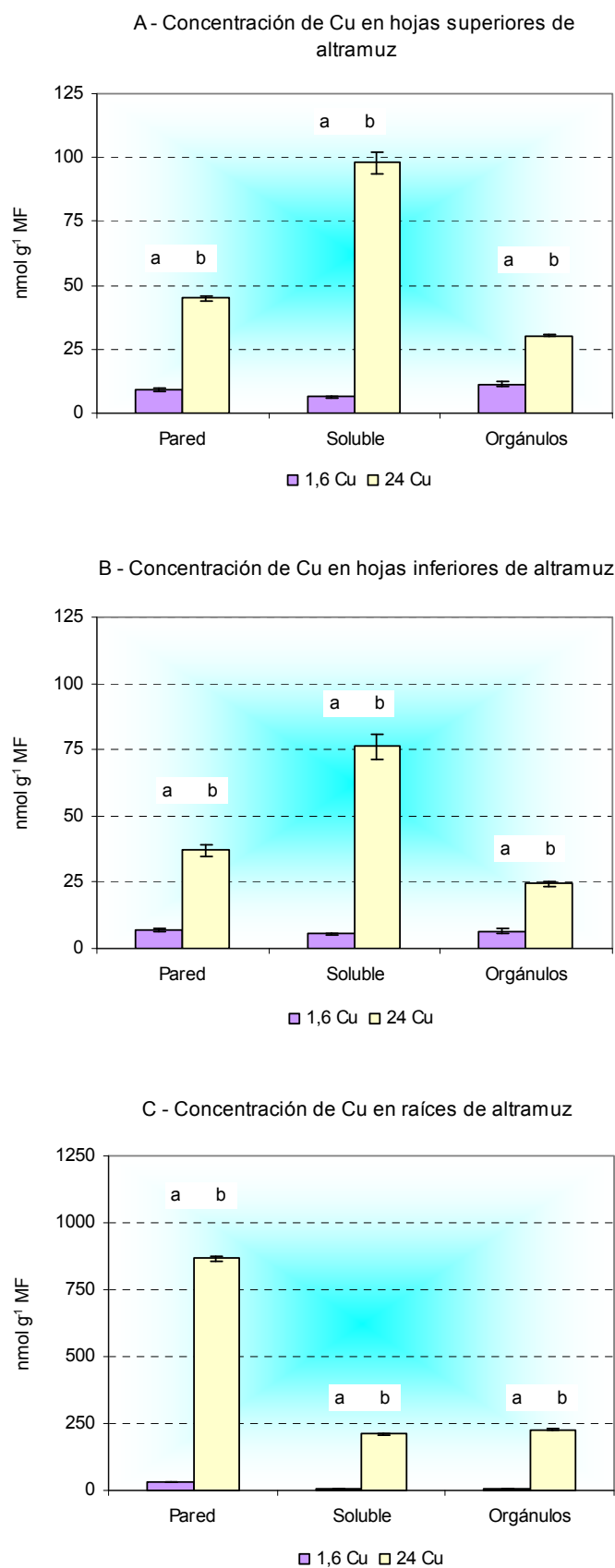


Fig. 1. Concentración de Cu en pared celular, fracción soluble y orgánulos en HS (A), HI (B) y raíz (C) de plantas de altramuz cultivadas durante 35 días con 1,6 y 24 μM Cu

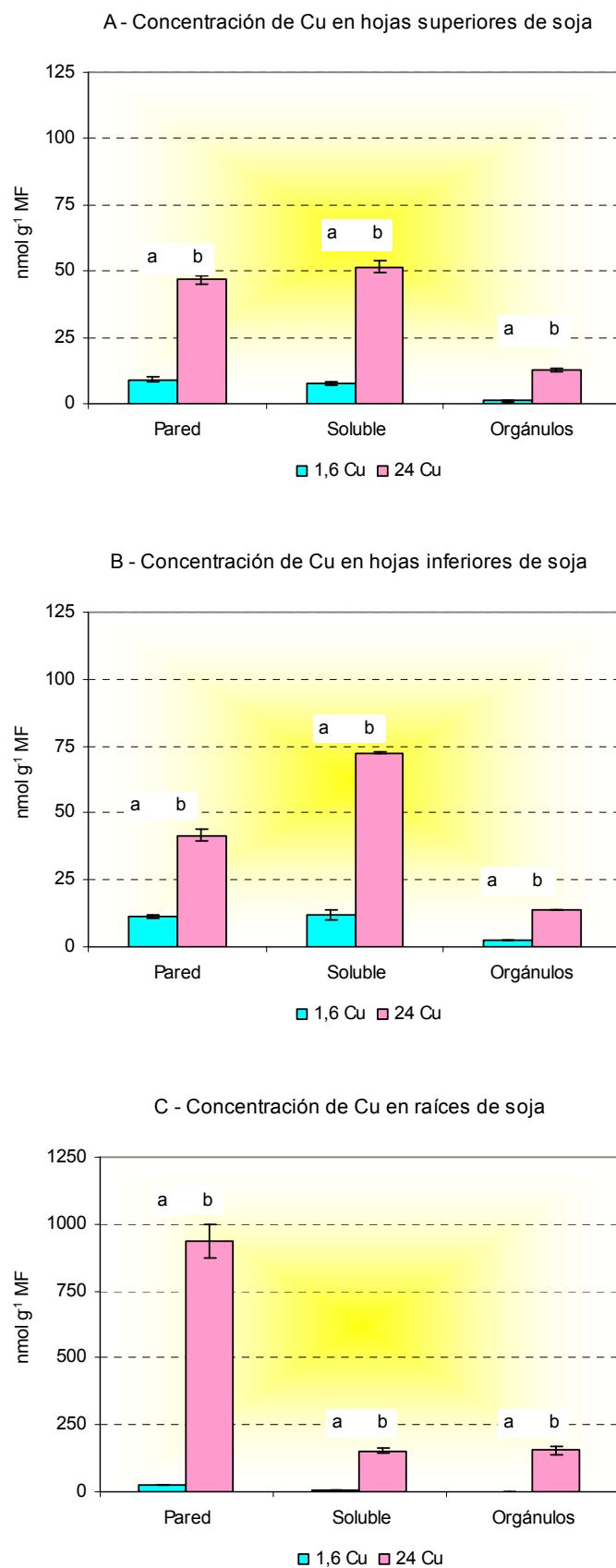


Fig. 2. Concentración de Cu en pared celular, fracción soluble y orgánulos en HS (A), HI (B) y raíz (C) de plantas de soja cultivadas durante 35 días con 1,6 y 24 μM Cu

Por otro lado, se han calculado los porcentajes de contribución del Cu presente en cada fracción subcelular al total, en cada uno de los órganos analizados en las plantas de altramuza y soja tratadas con 1,6 y 24 μM de Cu (Figs. 3 y 4). En las HS de las plantas de altramuza sometidas al tratamiento 1,6 μM , el Cu se distribuye de la siguiente manera: orgánulos \approx pared $>$ soluble. Del 43% localizado en los orgánulos, un 26% se encuentra en los cloroplastos, mientras que el resto se reparte entre las otras fracciones. En las HI se detecta un comportamiento similar, mientras que en la raíz, en torno a un 72% del Cu total se localiza en la pared celular, un 17% en la fracción soluble y un 11% en los orgánulos. Al tratar las plantas de altramuza con 24 μM Cu, el % de metal en la fracción soluble de las hojas se duplica, con respecto a los % del control, siendo esta fracción la mayoritaria en hojas, seguida de pared y orgánulos. Además, el aporte de 24 μM Cu a la planta de altramuza disminuye, respectivamente un 68% y un 45% el porcentaje de Cu localizado en los cloroplastos de las hojas superiores e inferiores (Fig. 3).

En las plantas de soja cultivadas con 1,6 μM Cu, cerca del 51% y 68% de Cu, se encuentra localizado en la pared de las células de las HS y de la raíz, respectivamente, mientras que, en las hojas inferiores, los % de Cu localizado en pared y en la fracción soluble dan valores similares (45%). Cuando la planta de soja se trata con 24 μM Cu, se observa un aumento de % de Cu en la fracción soluble y especialmente en los orgánulos de las HS. En las inferiores aumenta el Cu soluble y no varía el % de Cu en los orgánulos. Si bien en ambos casos, el Cu se localiza mayoritariamente en la fracción soluble, seguido de la pared celular y los orgánulos (Fig. 4). En raíz, el suministro de 24 μM de Cu estimula el % de acumulación de Cu en las paredes celulares y en los orgánulos, a costa del soluble; siendo la pauta de distribución pared $>$ orgánulos \approx soluble.

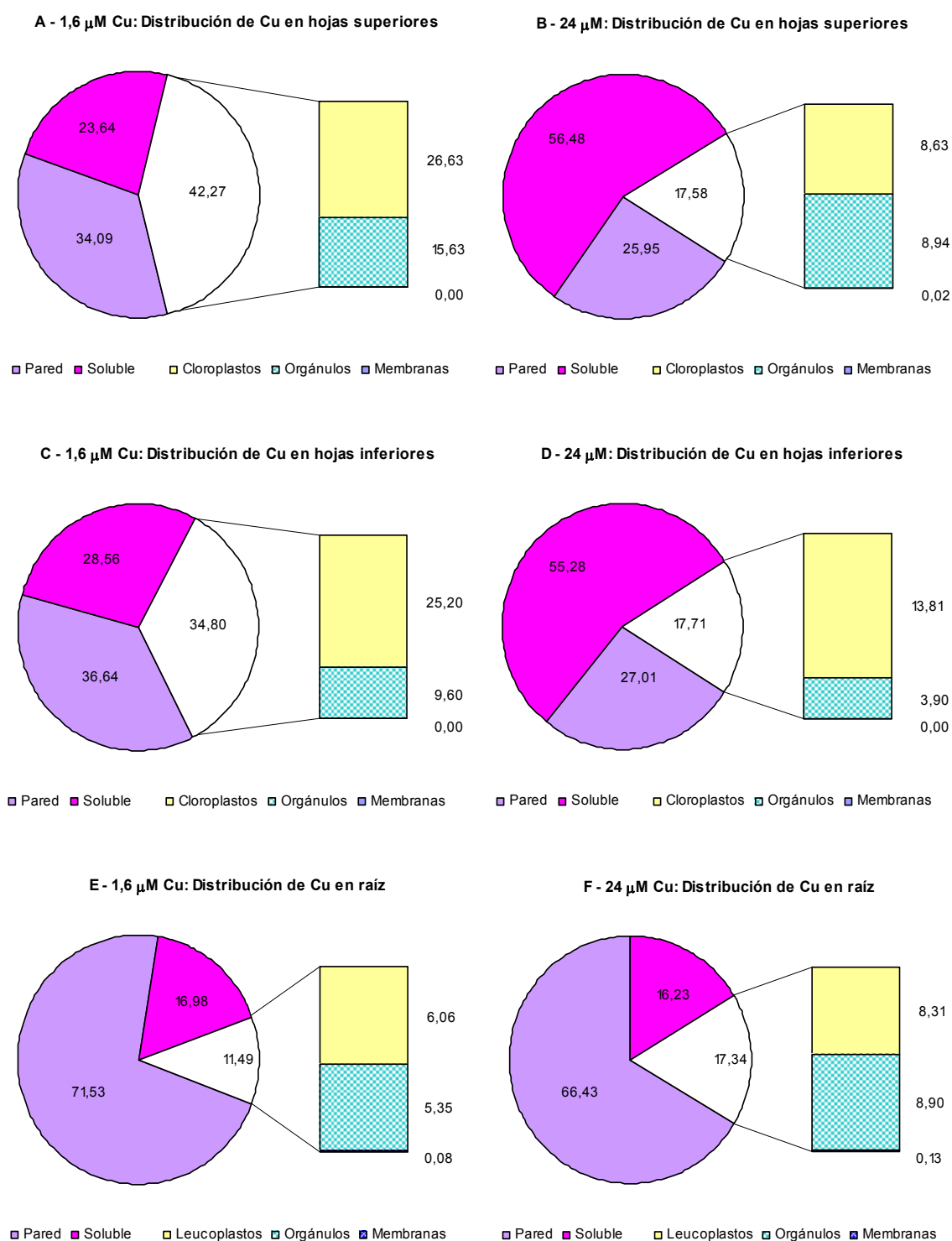


Fig. 3. Porcentajes de contribución de Cu en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de altamuz cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

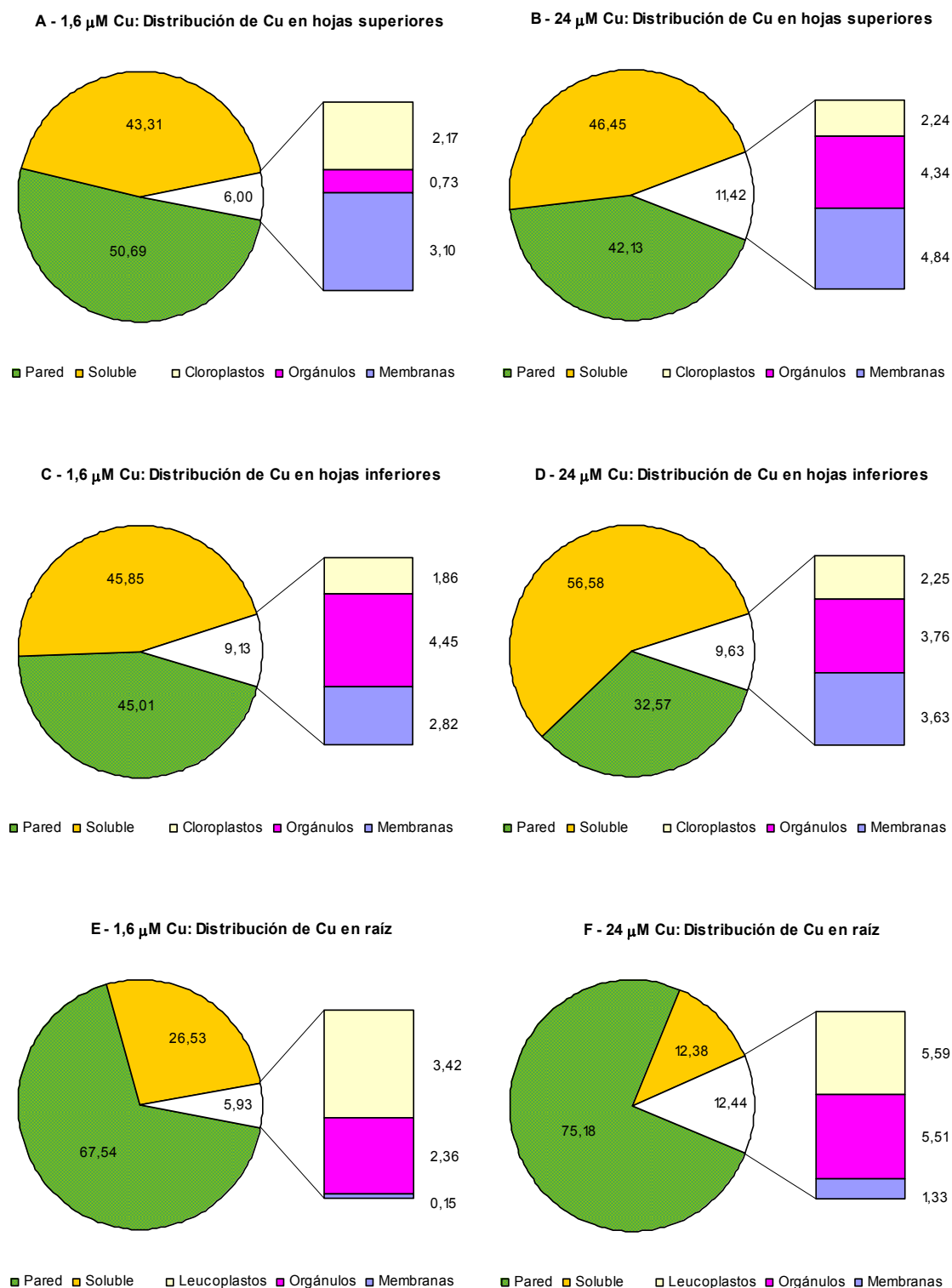


Fig. 4. Porcentajes de contribución de Cu en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de soja cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

1.2. Concentración y distribución subcelular de Fe

Los valores medios de la concentración de Fe en las distintas fracciones subcelulares de HS, HI y raíces de plantas de altramuza y soja tratadas con 1,6 y 24 μM de Cu, se recogen en la [Tabla V.2](#) del apéndice. En las hojas superiores e inferiores de altramuza la concentración de Fe en la pared de las células no se modifica por efecto de los tratamientos de Cu. Sin embargo, el Fe soluble y el localizado en los orgánulos de las células de las hojas, se reduce a la mitad con el aporte de 24 μM Cu. Además, la concentración de Fe en las paredes celulares y en los orgánulos de las raíces de altramuza aumenta significativamente al hacerlo la dosis de Cu, en cambio disminuye el Fe presente en la fracción soluble.

Las hojas de las plantas de soja cultivadas con 24 μM Cu dan valores de Fe significativamente más bajos que las del control. Estos descensos son especialmente destacables en todas las fracciones subcelulares de las HS, con reducciones que alcanzan el 70%. Por el contrario, el aumento en la dosis de Cu, hace que las raíces de soja acumulen 10 veces más Fe en las paredes celulares y orgánulos que las procedentes del tratamiento 1,6 μM Cu.

Los porcentajes de contribución de la concentración de Fe en cada fracción al total en los distintos órganos de la planta de altramuza, no experimentan grandes variaciones con el aumento en el suministro de Cu ([Fig. 5](#)). En torno a un 50% del Fe presente en las HI se encuentra localizado en los cloroplastos, otros orgánulos y membranas. En las HS aumenta hasta el 60%. El resto del Fe se distribuye casi por igual entre la pared celular y la fracción soluble. En raíz, un 70% del Fe se localiza en las paredes de las células, un 27% en orgánulos y sólo un 2% está en forma soluble. Cuando el altramuza se cultiva con 24 μM de Cu, disminuye ligeramente el Fe presente en la pared, pero aumenta en las otras dos fracciones analizadas.

En la planta de soja, se observa un comportamiento bastante similar al de altramuza, es decir el % de Fe localizado en los distintos órganos experimenta pocas variaciones con la dosis externa de Cu ([Fig. 6](#)). Con independencia de la dosis de Cu, el

Fe se localiza principalmente en la pared celular de las HS (> 46%) y de la raíz (> 55%), mientras que en las HI lo hace en los orgánulos (> 46%).

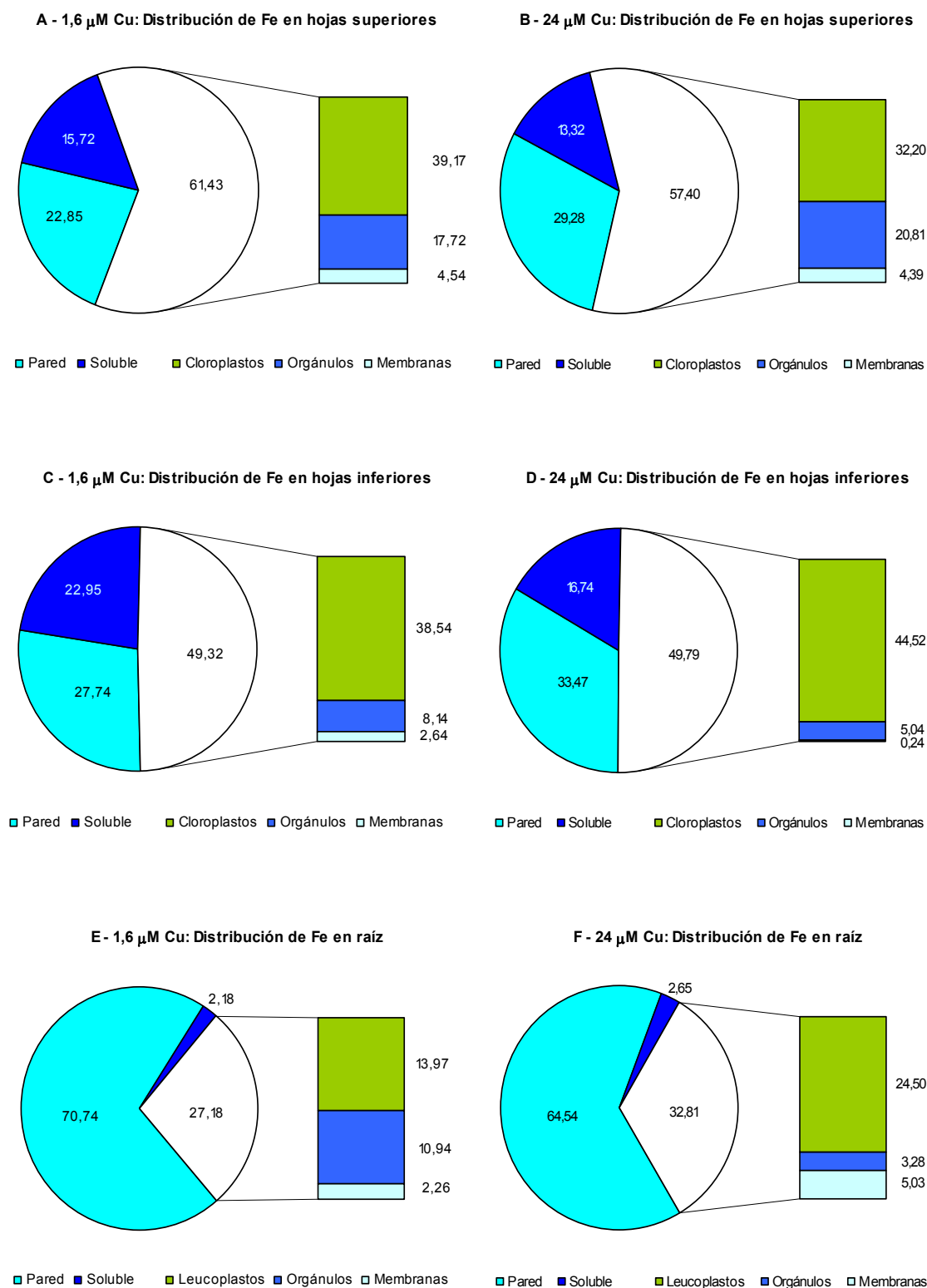


Fig. 5. Porcentajes de contribución de Fe en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de altamiz cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

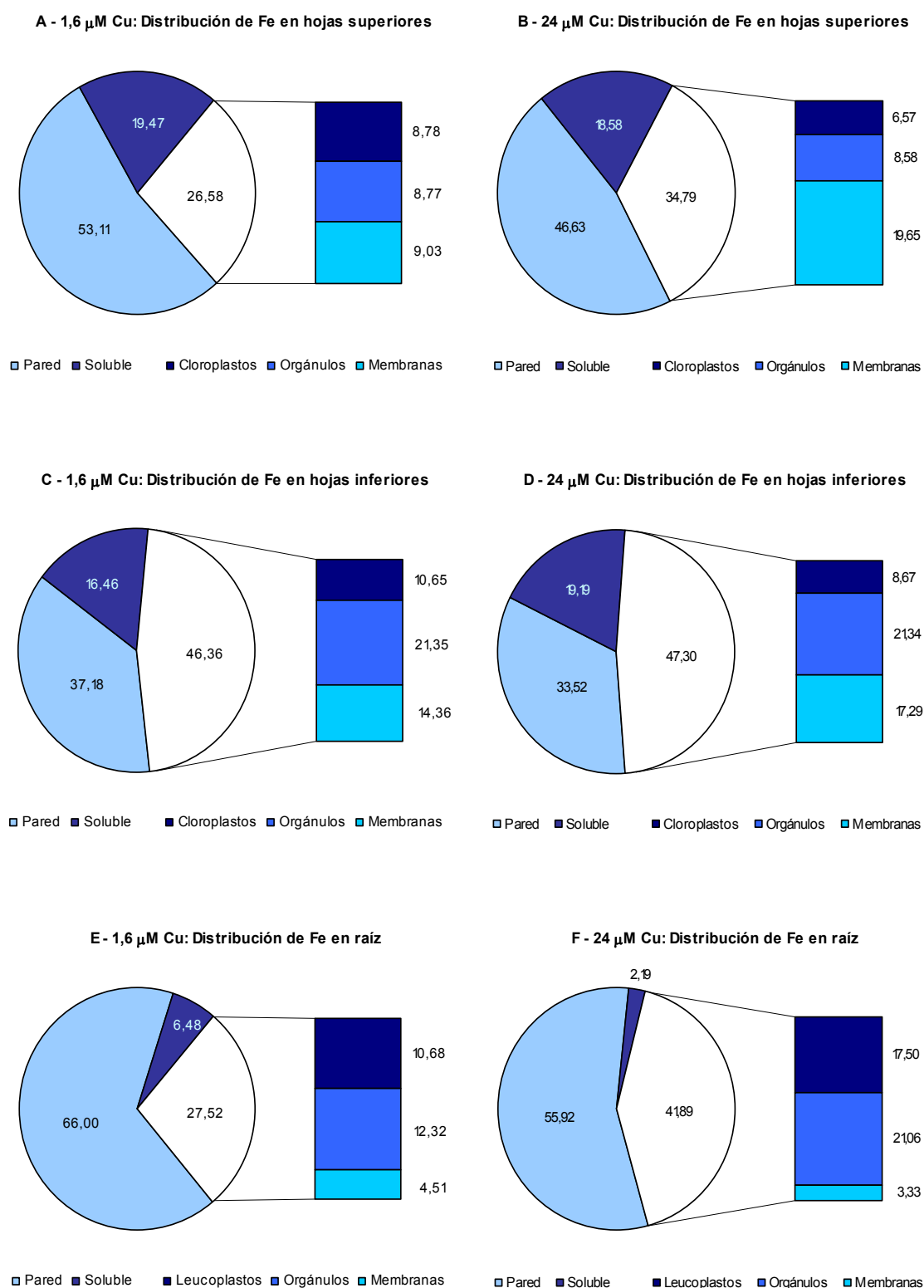


Fig. 6. Porcentajes de contribución de Fe en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de soja cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

1.3. Concentración y distribución subcelular de Mn

Los resultados de la concentración de Mn en las distintas fracciones subcelulares de HS, HI y raíces de plantas de altramuza y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM Cu, se muestran en la [Tabla V.3](#) del apéndice. En altramuza, el aporte de 24 μM Cu provoca un aumento significativo de la concentración de Mn en la pared celular de las HS y en la fracción soluble de las HS y HI de la planta. Estos incrementos van acompañados de descensos significativos de la concentración de Mn en los orgánulos y membranas celulares de las HS. Además, las raíces tratadas con la dosis más alta de Cu tienen una concentración de Mn en pared celular y orgánulos más elevada que las del tratamiento control. El Mn soluble no se ve afectado por la dosis de Cu suministrada. En soja, el aumento de la dosis de Cu en el medio de cultivo, promueve una fuerte acumulación de Mn en todos los órganos analizados. Este hecho adquiere una significación especial en las raíces, ya que los valores de Mn soluble, en pared celular y orgánulos, se multiplican con respecto al control por 5, 7 y 6, respectivamente. Sólo la concentración de Mn soluble en las HI no experimenta ninguna variación con la dosis de Cu suministrada.

Al igual que en el caso del Fe, el aporte de 24 μM de Cu casi no afecta a la distribución subcelular de Mn en la planta de altramuza. En las HS y HI, la pauta de distribución encontrada para ambas dosis de Cu es la siguiente: orgánulos > pared > soluble; siendo el % de Mn encontrado en los orgánulos algo superior al 46% para ambos tratamientos de Cu y órganos. Si bien, el aporte de la dosis más alta de Cu reduce ligeramente el % de Mn en los orgánulos y aumenta el localizado en la pared celular y en la fracción soluble. En la raíz de altramuza, con independencia de la dosis de Cu, es la pared de las células, la fracción que acumula una mayor cantidad de Mn (44%), seguida de las fracciones de orgánulos y soluble ([Fig. 7](#)). Asimismo la dosis más alta de Cu aplicada a la soja, tampoco modifica el gradiente de distribución subcelular de Mn ([Fig. 8](#)). Los % más altos se encuentran en la pared celular de todos los órganos vegetales. Cabe destacar, que a medida que aumenta el nivel de Cu en el medio lo hace el % de Mn en la pared celular y se reduce en los orgánulos y en la

fracción soluble. En las HS, el % de Mn pasa de algo más del 61% en las control al 73% en las tratadas con 24 μM Cu y de un 46% a un 53% en las raíces.

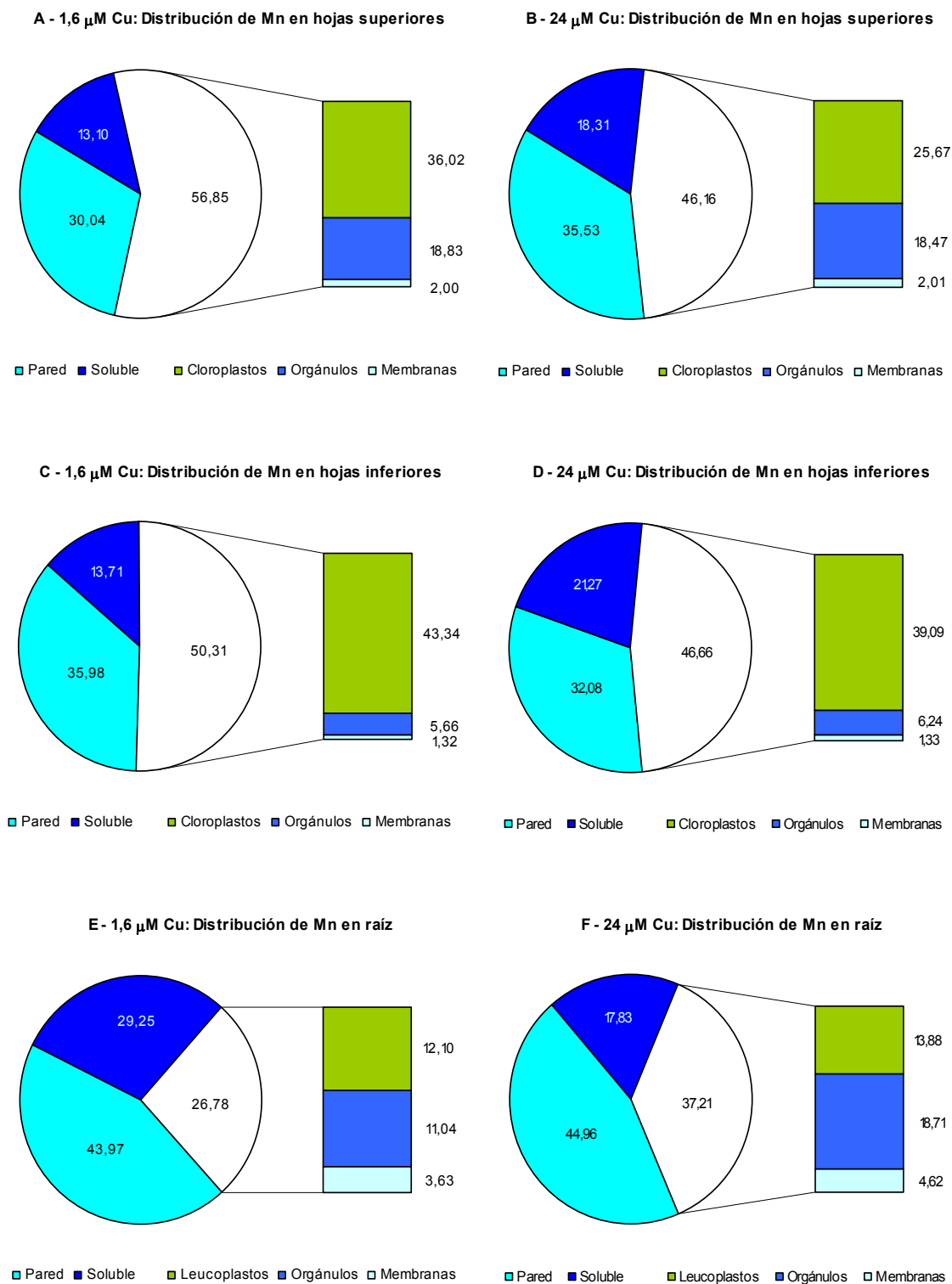


Fig. 7. Porcentajes de contribución de Mn en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de altramuz cultivadas con 1,6 y 24 μM Cu

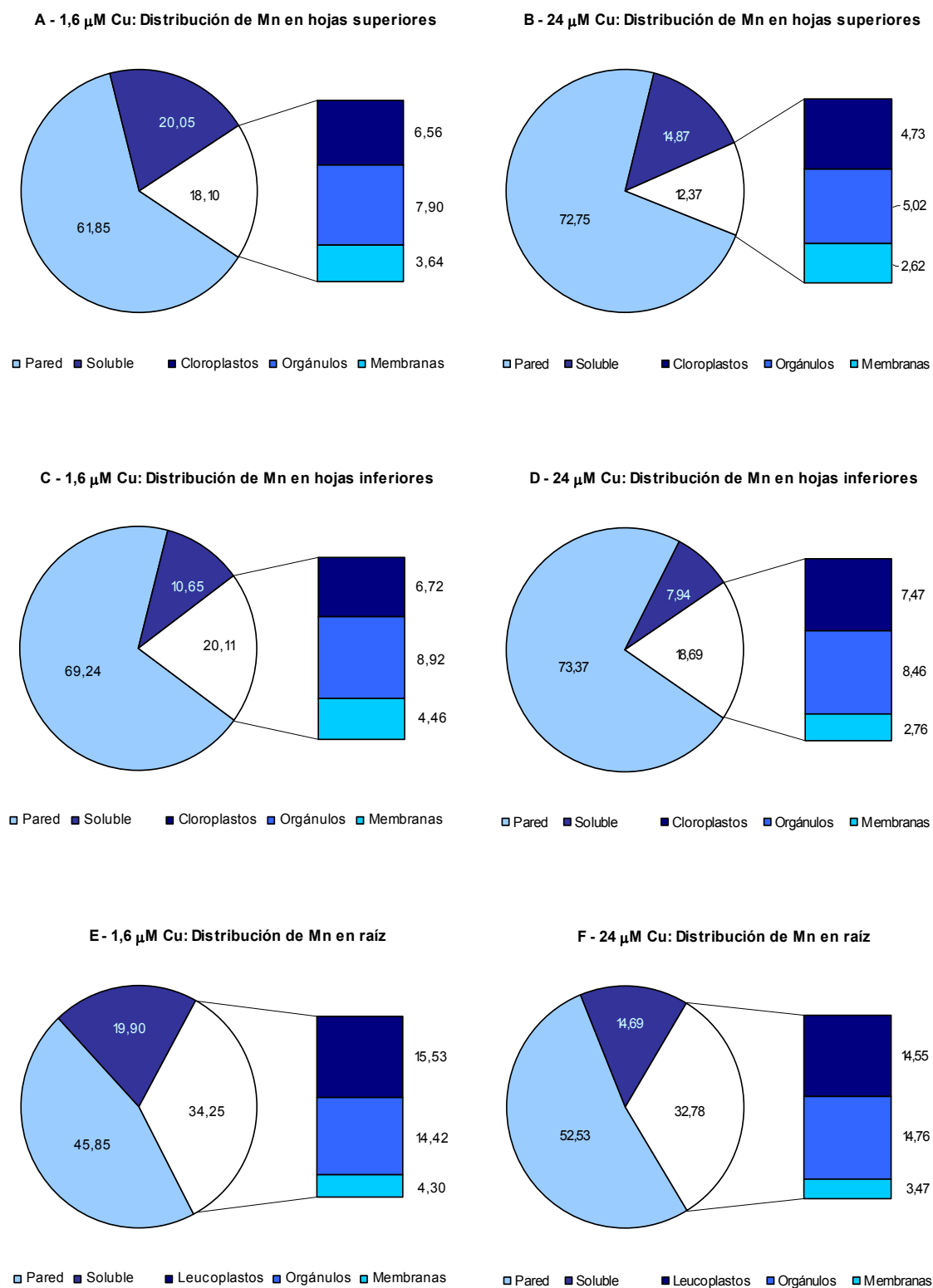


Fig. 8. Porcentajes de contribución de Mn en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de soja cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

1.4. Concentración y distribución subcelular de Zn

La concentración de Zn presente en las distintas fracciones subcelulares de HS, HI y raíces de plantas de altramuza y soja, cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu, se muestra en la [Tabla V.4](#) del apéndice. El suministro de 24 μM de Cu a plantas de altramuza, causa descensos significativos de Zn en las paredes celulares y orgánulos de las HS y HI, en cambio, produce el efecto contrario en los valores de la fracción soluble. En la raíz, el Zn presente en la fracción soluble y en las paredes celulares, se reduce al aumentar la dosis de Cu, mientras que aumenta la concentración de Zn en los orgánulos. Las HS de las plantas de soja sometidas a la dosis más alta de Cu, acumulan más Zn en la fracción soluble, pared celular y en los orgánulos, que las procedentes del tratamiento control. En las HI también se detectan aumentos, excepto en orgánulos, cuya concentración no varía significativamente con la dosis de Cu. Además en raíz, la concentración de Zn en la pared celular de las plantas tratadas con la dosis más alta de Cu se triplica en comparación al control, mientras que se reduce en las otras dos fracciones subcelulares.

Del Zn total en las HS y HI de las plantas de altramuza, un 45% se encuentra en orgánulos, un 35% en pared, y el resto, corresponde a la fracción soluble ([Fig. 9](#)). El aporte de 24 μM Cu reduce el % de Zn en los orgánulos de las hojas, mientras que aumenta considerablemente el soluble, lo que provoca en las HS un cambio en la distribución subcelular: fracción soluble > pared \approx orgánulos. Este efecto no se observa en las HI. En raíz, el Zn se almacena en las paredes celulares para ambas dosis de Cu (> 54%), si bien, el aumento en la dosis de Cu incrementa el % de Zn en los orgánulos, pero reduce intensamente el Zn soluble. Con respecto a la planta de soja, las HS de las plantas control almacenan el mismo % de Zn en pared y en la fracción soluble (42%). Las HI localizan un mayor % de este metal en pared celular (46%), mientras que en la raíz la fracción mayoritaria corresponde a los orgánulos (63%). Al aumentar el nivel de Cu en la disolución nutritiva, varía la pauta de distribución de Zn en todos los órganos de la planta de soja; destacando los aumentos de Zn en las paredes celulares de las raíces de soja que se van desde un 19% a un 51% ([Fig. 10](#)).

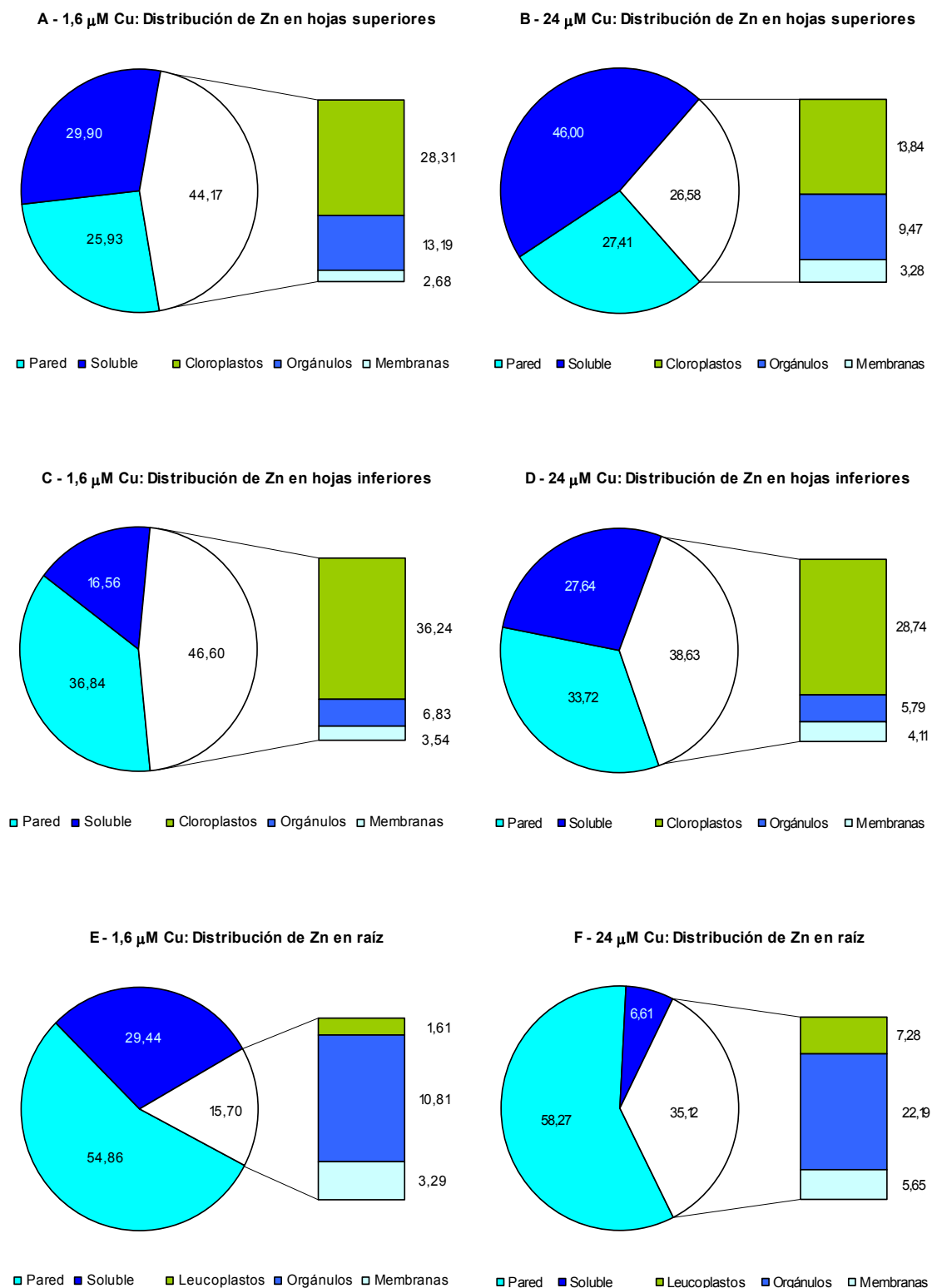


Fig. 9. Porcentajes de contribución de Zn en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de altramuz cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

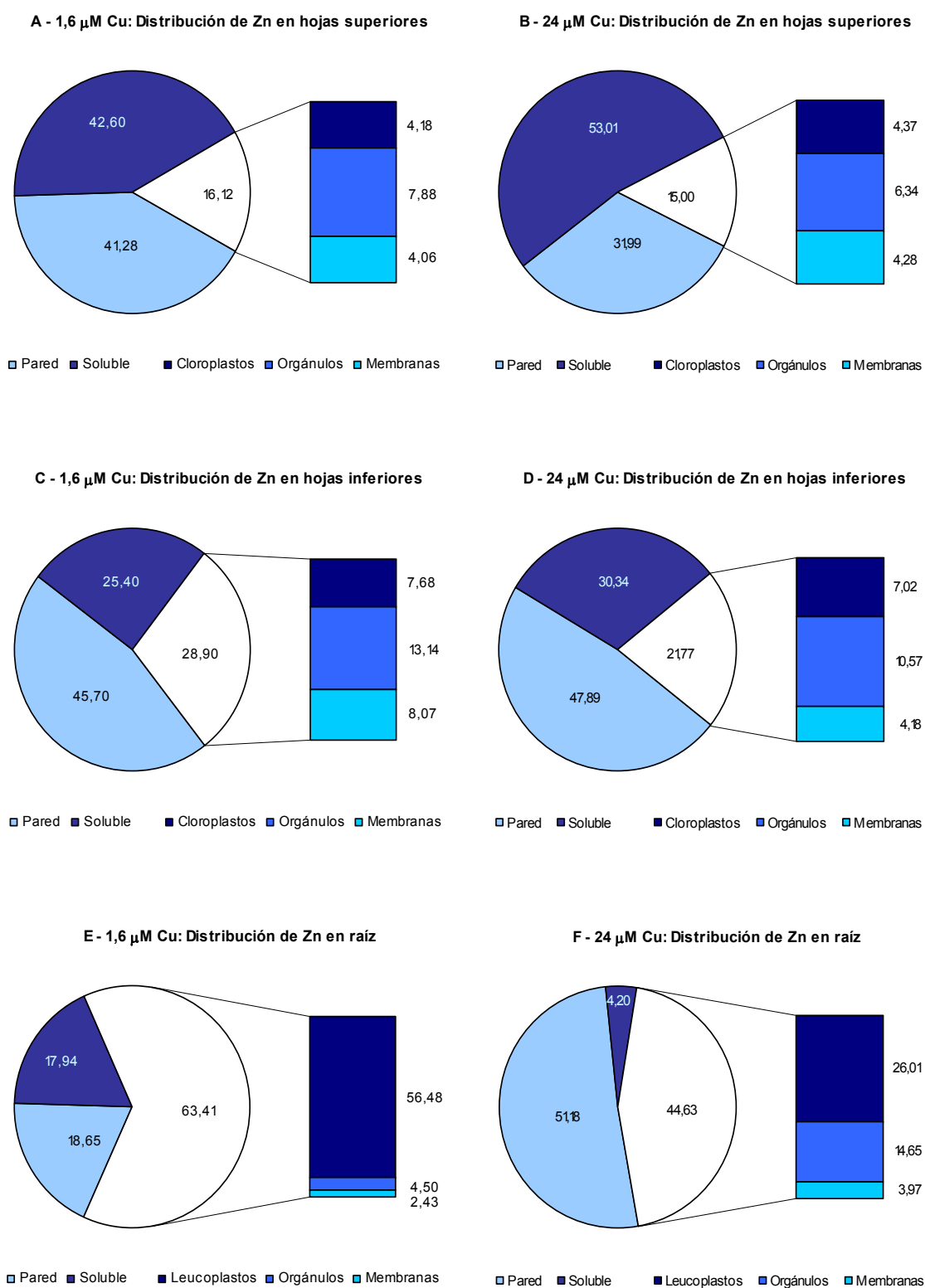


Fig. 10. Porcentajes de contribución de Zn en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de soja cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

1.5. Concentración y distribución subcelular de K

Los valores de la concentración de K en las distintas fracciones subcelulares de las HS, HI y raíces de plantas de altramuzy y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu, se recogen en la [Tabla V.5](#) del apéndice. El aumento de la dosis externa de Cu no modifica, en ningún órgano analizado, la concentración de K en las paredes de las células. El K soluble sólo desciende en las raíces, pero se triplica en los orgánulos de este órgano vegetal. La concentración de K en los orgánulos de las hojas de altramuzy cultivadas con 24 μM de Cu se reduce ostensiblemente en comparación a los valores del control. En general, la concentración de K en las distintas fracciones analizadas en las HI de soja no se ve afectada por el aumento del Cu en la disolución nutritiva. Por el contrario, se observa una acumulación de K en todas las fracciones de las HS y también del K localizado en la pared de las células de la raíz.

Por otro lado, los porcentajes de contribución de K en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS, HI y raíz de plantas de altramuzy y soja aparecen reflejados en las [Figs. 11 y 12](#), respectivamente. Como era de esperar, en las hojas de ambos cultivos, la fracción de K que contribuye mayoritariamente al total es la soluble, con valores que superan el 60%. El resto se localiza en las paredes y menos del 5% se encuentra en orgánulos y membranas. En las raíces se observan unos porcentajes de contribución al total muy similares a los comentados en las hojas. Al aumentar la dosis de Cu en el medio de cultivo, se mantiene la distribución subcelular de K en las hojas de altramuzy, si bien, disminuye el % de K localizado en los orgánulos de las células foliares, especialmente en los de las HS. Por el contrario, lo incrementa en raíz, pero es la pared celular la que acumula una mayor cantidad de K. En soja el aporte de 24 μM de Cu modifica poco los porcentajes de distribución de K entre las distintas fracciones subcelulares.

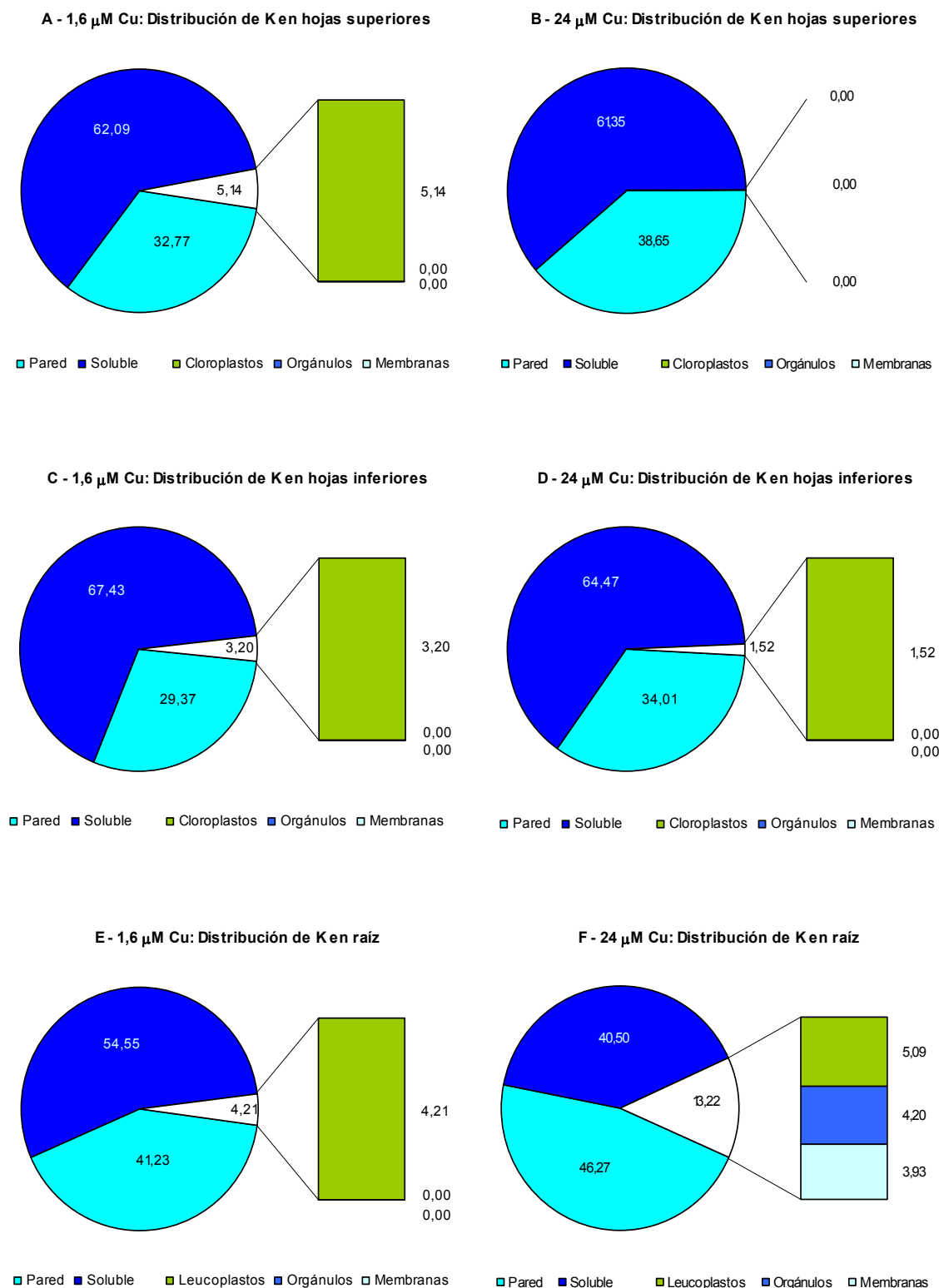


Fig. 11. Porcentajes de contribución de K en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de altamuz cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

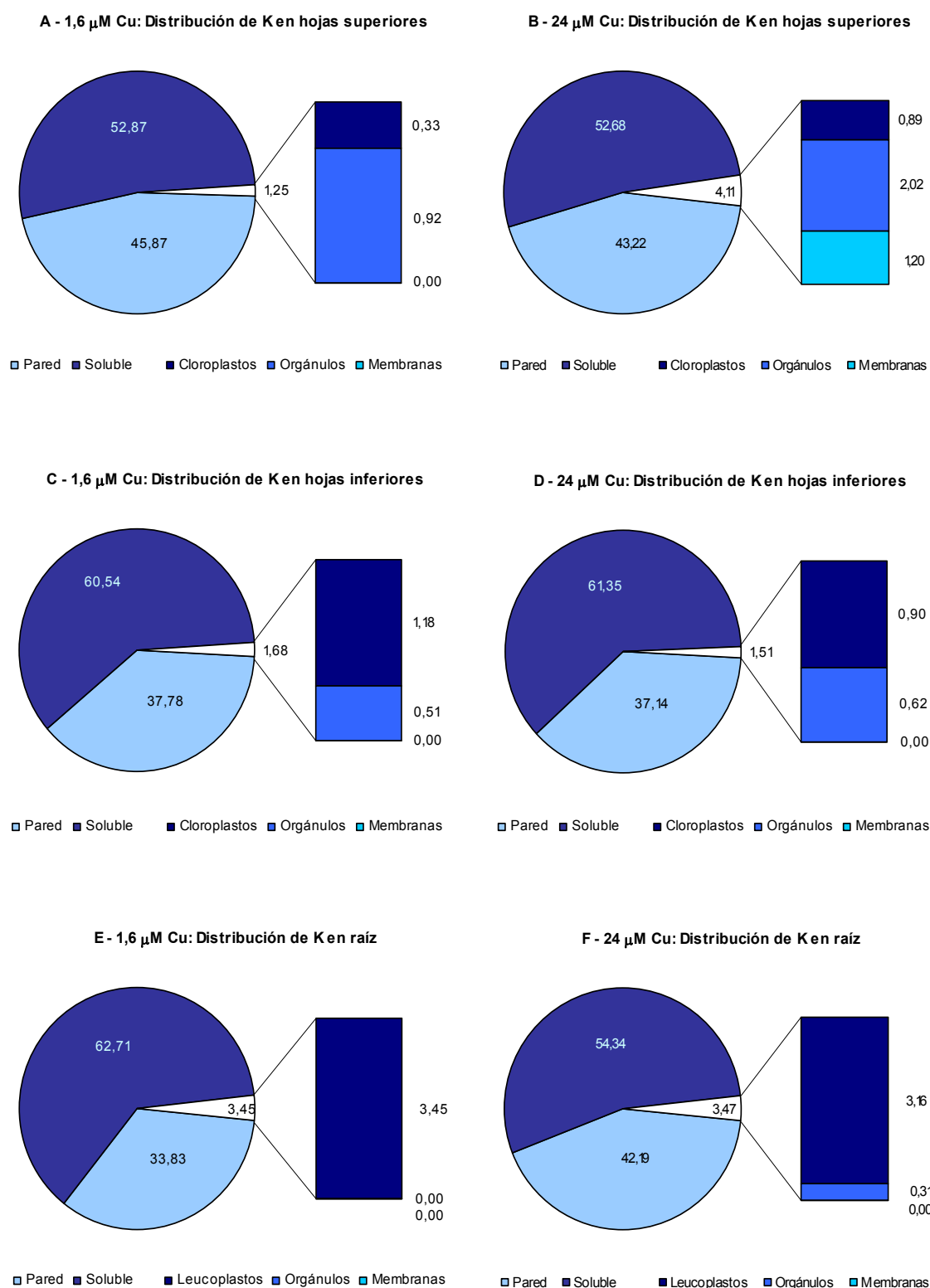


Fig. 12. Porcentajes de contribución de K en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de soja cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

1.6. Concentración y distribución subcelular de Ca

En la [Tabla V.6](#) del apéndice se muestran los datos de concentración de Ca en las distintas fracciones subcelulares de HS, HI y raíces de plantas de altramuza y soja tratadas con 1,6 y 24 μM Cu. La fracción soluble de Ca no experimenta, en altramuza, ninguna variación significativa por efecto de los tratamientos de Cu. Sin embargo, a medida que aumenta la dosis, se acrecienta la acumulación de Ca en las paredes de las células de las HS y de la raíz, y se observa, igualmente, una reducción del Ca presente en los orgánulos y membranas celulares de todas las hojas de la planta. En raíz esta fracción se intensifica en las plantas tratadas con la dosis más alta de Cu. Las HI de las plantas de soja tratadas con 1,6 y 24 μM de Cu presentan valores similares de Ca. En las HS se detecta un aumento de Ca en todas las fracciones, aunque es especialmente destacable el incremento del Ca soluble. En raíz, se observan valores de Ca en pared celular y orgánulos más elevados en las cultivadas con la dosis más alta de Cu que en el control.

Cada fracción analizada en las hojas de altramuza contribuye con aproximadamente un 30% al total de Ca presente en los órganos vegetales ([Fig. 13](#)). En las hojas de soja, el % de Ca en orgánulos y membranas se reduce hasta el 20%, el resto del Ca se distribuye al 50% entre las otras dos fracciones, soluble y pared celular ([Fig. 14](#)). En las raíces de altramuza más del 50% del total de Ca se encuentra en las paredes. En las de soja este mismo % lo presenta el Ca soluble. Cuando el cultivo se realiza con una dosis más elevada de Cu, en las hojas de altramuza se reduce la contribución al total de Ca en membranas y orgánulos, pero aumenta el % de Ca soluble. En las hojas de soja, no existe una tendencia definida en las HS y HI. En las raíces de ambas leguminosas, la dosis más elevada de Cu disminuye el % de Ca soluble, pero aumenta el % en pared celular y orgánulos.

1.7. Concentración y distribución subcelular de Mg

La concentración de Mg presente en las distintas fracciones subcelulares de hojas superiores, inferiores y raíces de plantas de altramuza y soja sometidas a 1,6 y 24

μM Cu se puede observar en la [Tabla V.7](#) del apéndice. En altramu, el aumento de la dosis de Cu no modifica significativamente la concentración de Mg en las distintas fracciones analizadas en las hojas de esta leguminosa.

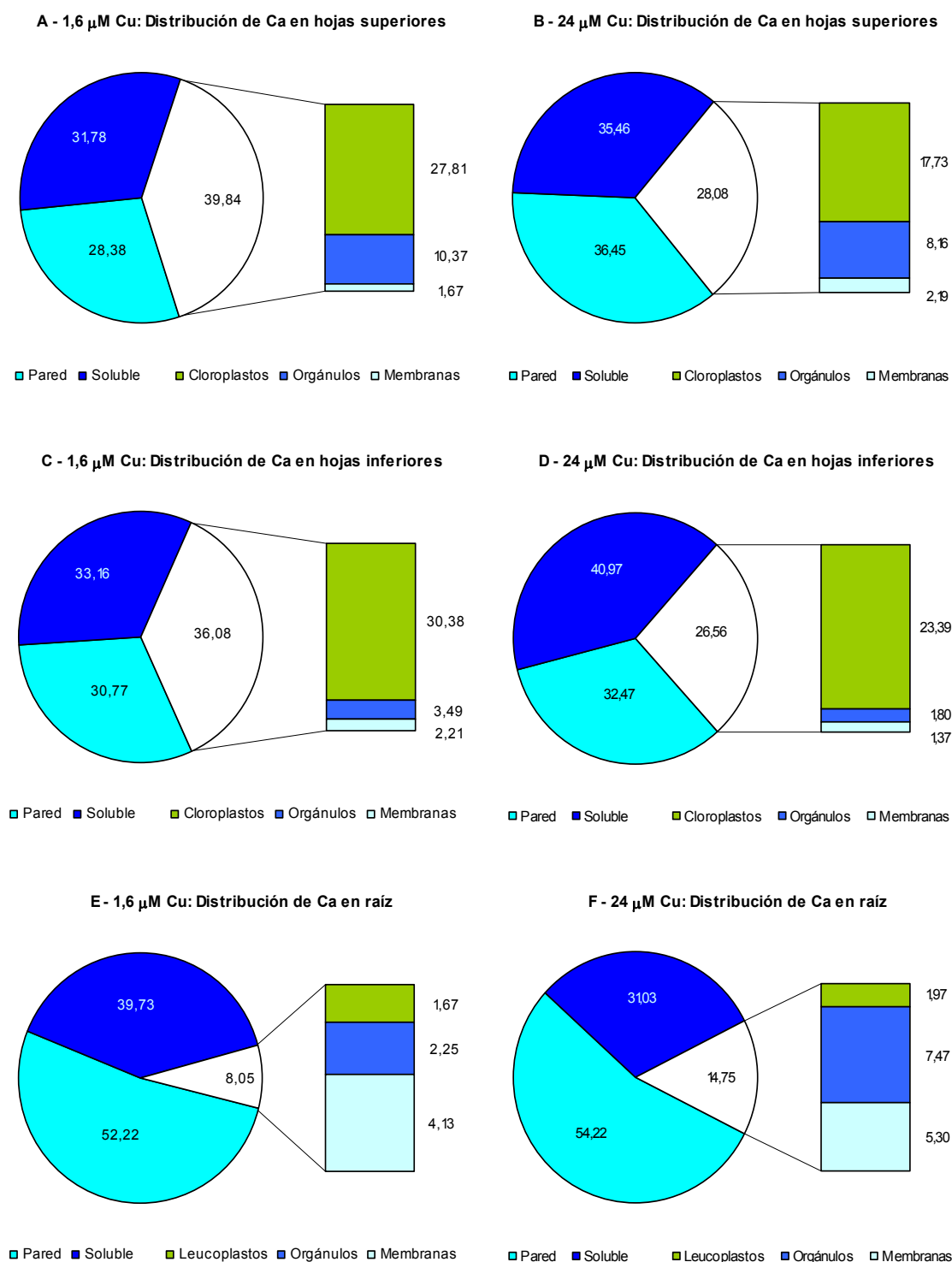


Fig. 13. Porcentajes de contribución de Ca en pared celular, fracción soluble y orgánulos al en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de altramu cultivadas con 1,6 y 24 μM Cu

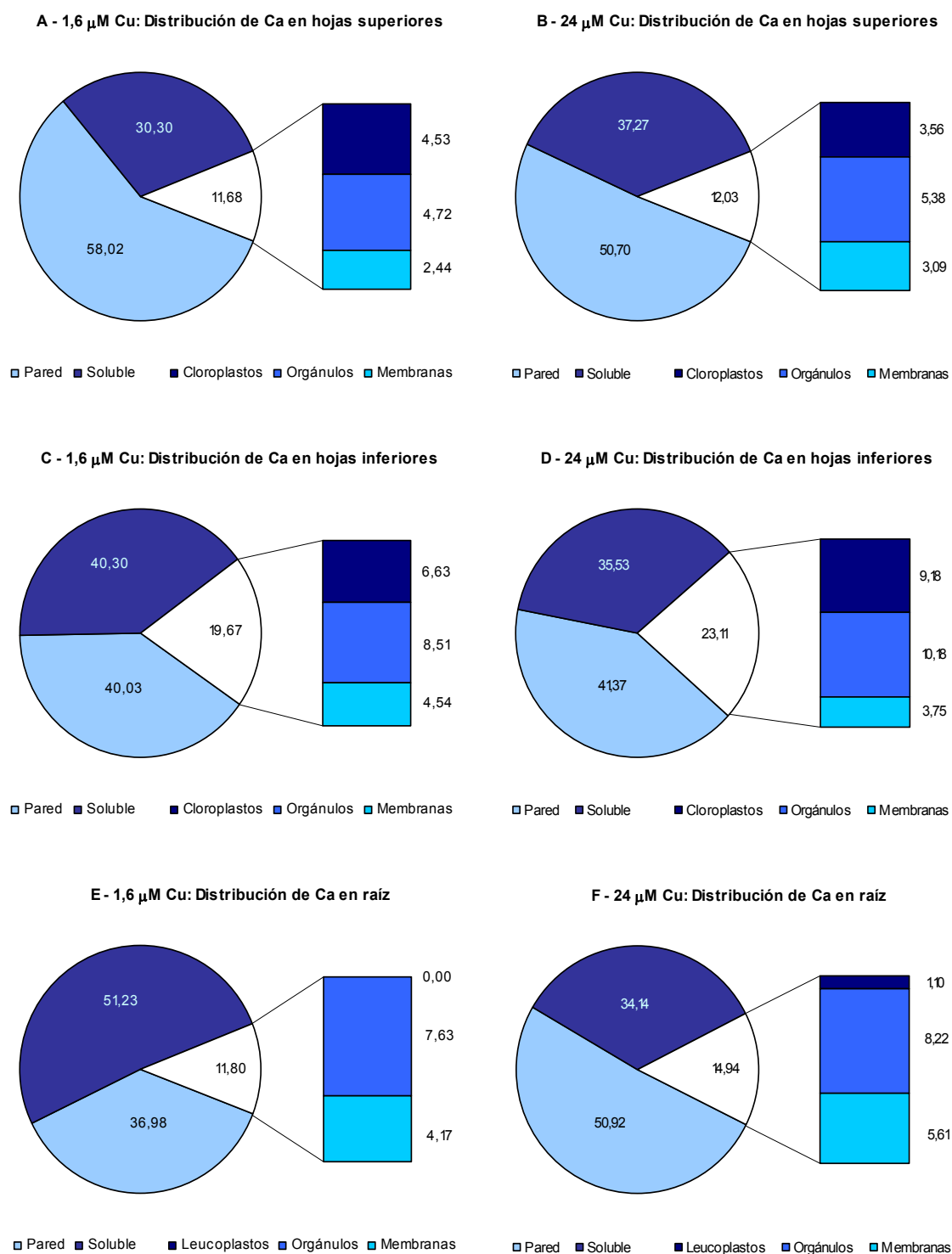


Fig. 14. Porcentajes de contribución de Ca en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de soja cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

En las raíces de altramuza, el Mg soluble y el localizado en las paredes celulares disminuyen en las plantas tratadas con 24 μM de Cu al compararlas con el control. En soja, el Mg soluble y el localizado en las paredes de las células experimentan un aumento en las HS y HI de las plantas tratadas con 24 μM de Cu. En los orgánulos de las hojas, no se detectan variaciones significativas entre los dos tratamientos de Cu. En la raíz, se detecta una disminución del Mg soluble y del encontrado en los orgánulos con la dosis más alta de Cu (24 μM). En cambio, el Mg en la pared de las células de la raíz no experimenta ningún cambio significativo.

Si se examinan los porcentajes de contribución de Mg en cada fracción al total en las HS, HI y raíz de las plantas de altramuza y soja (Figs. 15 y 16), se detecta que más del 40% del Mg en las hojas de ambos cultivos está en la fracción soluble. El resto se distribuye casi al 50% entre las otras dos fracciones en las hojas de altramuza, mientras que en las de soja un 35% del total está en la pared celular y, el resto, en membranas y orgánulos. En la raíz de altramuza, un 50% del Mg está en la pared, mientras que en soja se encuentra en la fracción soluble. El suministro de 24 μM de Cu modifica poco estos % en las hojas de los dos cultivos. Sin embargo, en la raíz de altramuza disminuye el Mg soluble y aumenta en las otras dos fracciones. En la raíz de soja, la reducción del Mg soluble va acompañada de un incremento del % de Mg en la pared celular.

1.8. Microlocalización de Cu en hojas y raíces

Los resultados de la microlocalización de Cu en el citoplasma-vacuola y pared celular de los tejidos foliares de plantas de altramuza y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu, se observan en la Fig. 17. Para ello se ha empleado microscopía electrónica de barrido a baja temperatura en conjunción con microanálisis de rayos X (LTSEM-EDXMA). En las hojas de altramuza, el aporte de 24 μM de Cu no aumenta el % de señal de Cu en ninguno de los compartimentos celulares estudiados (Figs. 17A-17B). Únicamente, el citoplasma-vacuola de las células del parénquima lagunar y la pared celular de la epidermis inferior dan valores 10 y 1,6 veces, respectivamente, más elevados que el control (1,6 μM Cu).

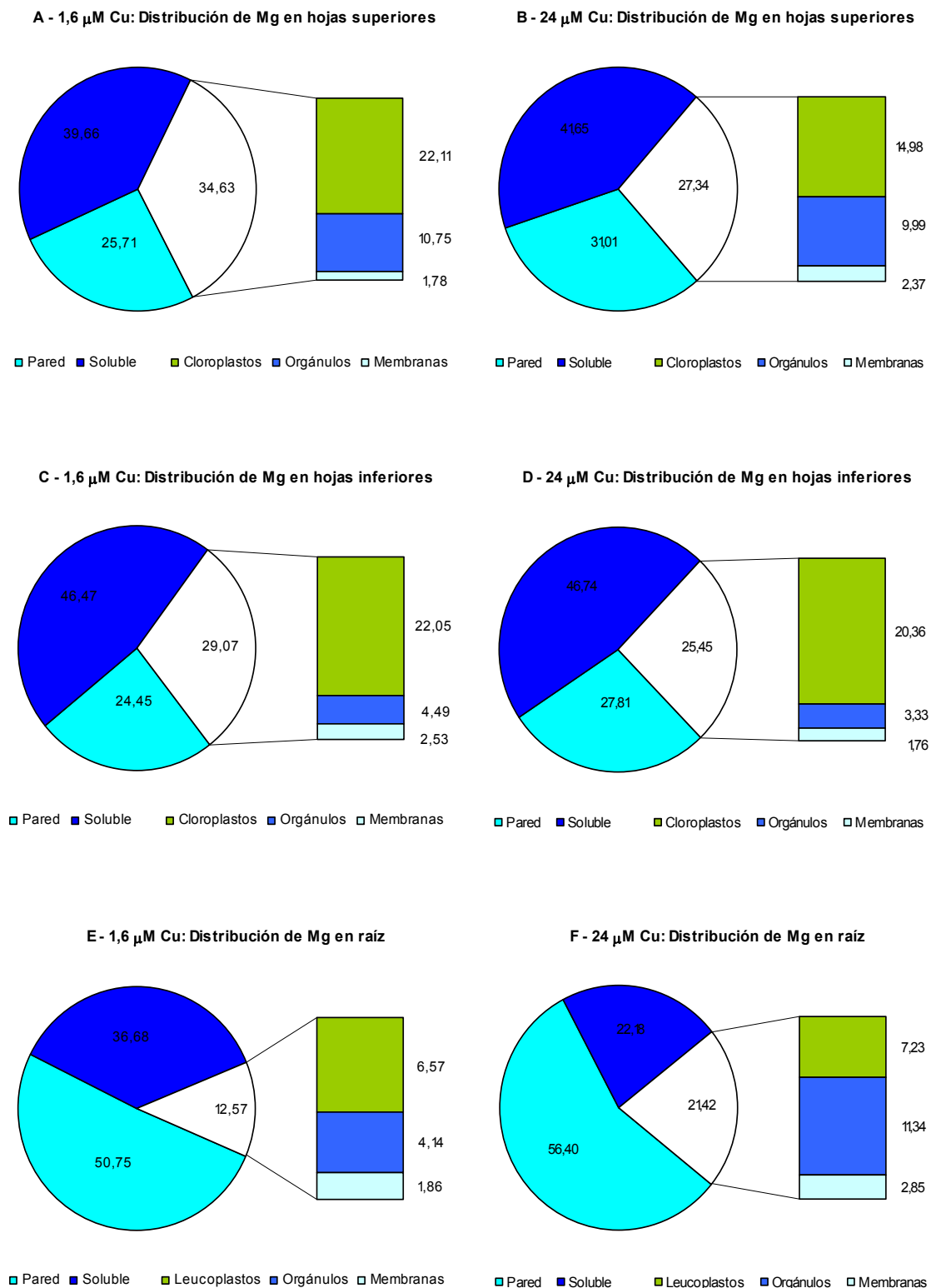


Fig. 15. Porcentajes de contribución de Mg en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de altamuz cultivadas con 1,6 y 24 μ M Cu

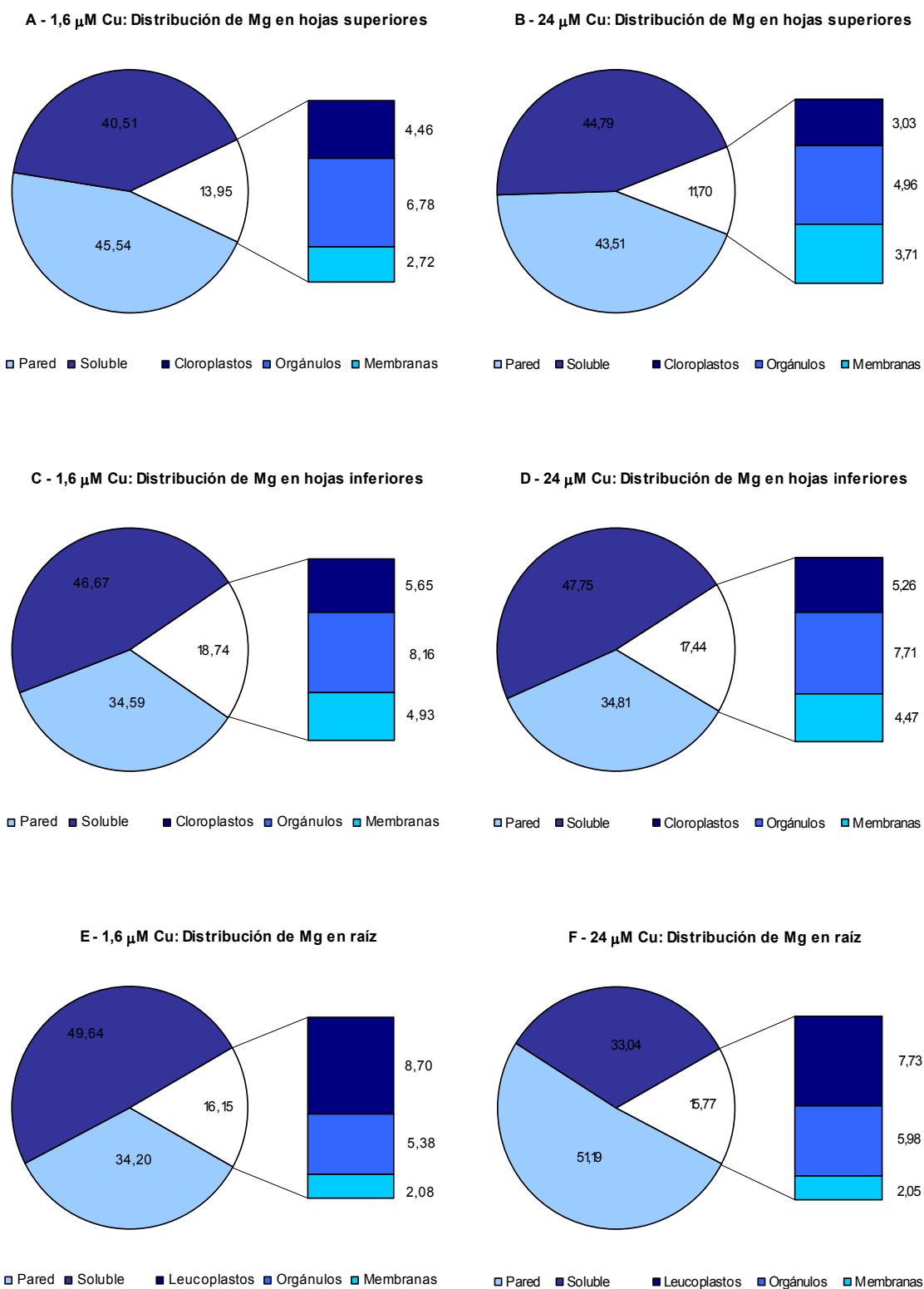


Fig. 16. Porcentajes de contribución de Mg en pared celular, fracción soluble y orgánulos al total en HS (A-B), HI (C-D) y raíz (E-F) de plantas de soja cultivadas con 1,6 y 24 μM Cu

Se ha encontrado un gradiente decreciente, desde la epidermis inferior a la superior, del Cu localizado en la pared celular para ambas dosis de Cu aplicadas; siendo el % de señal de Cu en la epidermis inferior 5 y 8 veces mayor, respectivamente, que en la superior de las hojas de altramuza tratadas con 1,6 y 24 μM Cu (Fig. 17B).

En las hojas de soja, el suministro de 24 μM Cu produce un aumento significativo del % de señal de Cu en las vacuolas de las células de la epidermis inferior (1,4 veces), en las paredes celulares del parénquima en empalizada (3,7 veces) y de la epidermis inferior (1,6 veces). Por el contrario, disminuye la señal de Cu en las vacuolas de las células del parénquima en empalizada (28%) y también en las paredes de la epidermis superior (23%); mientras que no varía en el resto de los tejidos (Figs. 17C-17D). En las hojas del tratamiento control, no se observa una pauta de distribución definida; sin embargo en las tratadas con 24 μM Cu, la señal de Cu en la pared disminuye progresivamente desde la epidermis abaxial a la adaxial de las hojas, mientras que en el citoplasma-vacuola se observa un % de señal mayor en la epidermis inferior que en el resto de tejidos vegetales (Figs. 17C-17D).

Por otro lado, el microanálisis de Cu y otros elementos en las paredes celulares de los tejidos radiculares de altramuza y soja no se ha podido llevar a cabo debido a la delgadez de las paredes. Tampoco se ha realizado el microanálisis en el citoplasma-vacuola de la rizodermis de las raíces altramuza, ya que está formada por una capa de células muy finas.

En cuanto a los resultados del microanálisis en las vacuolas de los tejidos radiculares de altramuza, al aumentar la dosis de Cu en el medio de cultivo, también lo hace el % de señal del metal en córtex externo de la raíz de altramuza (1,8 veces), sin embargo, no se observan diferencias significativas en el córtex interno ni cilindro central (Fig. 18A). En soja, el porcentaje de Cu en las vacuolas de los distintos tejidos vegetales aumenta con la dosis de Cu suministrada, salvo en el córtex externo que permanece inalterado (Fig. 18B). En las raíces de las plantas control la pauta de distribución es la siguiente: córtex externo > rizodermis > córtex interno. En las

células parenquimatosas del cilindro central de las raíces de las plantas tratadas con 1,6 μM no se detectó Cu. Sin embargo, en las cultivadas con 24 μM Cu, se observa un gradiente decreciente de Cu desde el exterior al interior de las raíces (Fig. 18B).

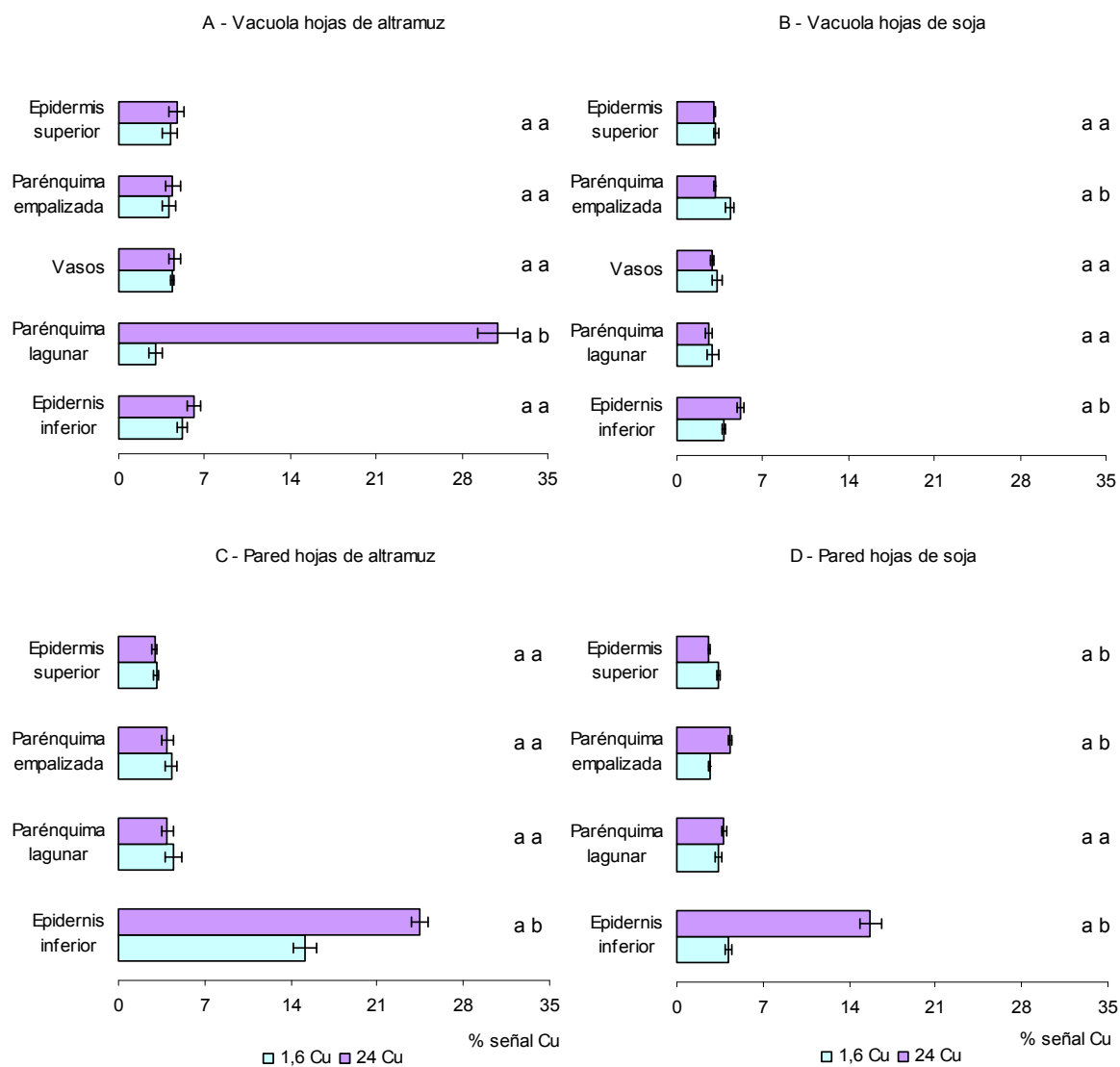


Fig. 17. Localización de Cu en secciones de hojas de altramuz (A y C) y soja (B y D) tratadas con 1,6 y 24 μM Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$)

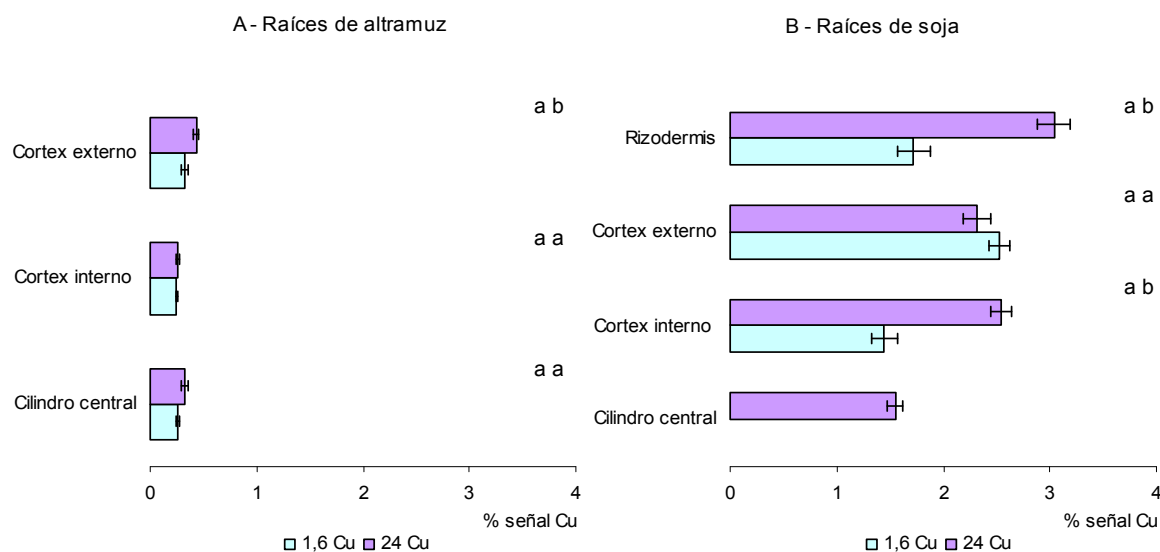


Fig. 18. Localización de Cu en secciones de raíces de plantas de altramu (A y C) y soja (B y D) tratadas con 1,6 y 24 µM Cu. Los resultados son las medias ± el E.T. (n = 4)

1.9. Microlocalización de Fe, Zn, Ni, P, K y Mg en hojas y raíces

Los resultados de la microlocalización de Fe, Zn y Ni en los distintos compartimentos analizados de hojas de altramu y soja sometidas a 1,6 y 24 µM de Cu se muestran en las Figs. 19-21. En general, al aumentar la dosis de Cu lo hace el % de señal de Fe, Zn y Ni en las vacuolas del tejido epidérmico, vascular y en el mesófilo de las hojas de altramu. Si bien, el Fe en las plantas tratadas con exceso de Cu, se localiza fundamentalmente en los vasos y en el parénquima lagunar, mientras que el Zn y Ni lo hacen principalmente en el último tejido mencionado. A su vez, el aporte de 24 µM Cu aumenta el % de señal de Zn encontrado en la pared de las células del mesófilo (1,7 veces). Sin embargo, los % de Fe y Ni en la pared de los tejidos de las hojas, no experimentan variaciones por efecto del aporte de 24 µM Cu, salvo en la epidermis inferior que aumentan en torno al doble con respecto al control. Asimismo, cabe destacar, que en las hojas de altramu cultivadas con 24 µM Cu, es la epidermis inferior el tejido que da mayores % de Fe, Zn y Ni en las paredes de las células. Con independencia de la dosis de Cu suministrada no se ha detectado Fe, Zn y Ni en ningún tejido de la raíz de altramu.

Con respecto a las hojas de soja, el exceso de Cu disminuye el % de señal de Fe en el interior de las células del parénquima en empalizada (33%) y la epidermis inferior (21%), así como el de Ni en este último tejido (43%) y en el parénquima lagunar (73%), en cambio, aumenta el % de señal de Zn. En la pared celular se observa un descenso de Fe y Ni en la mayoría de los tejidos analizados, llegando a no detectarse Zn en algunos casos. En el simplasto de las células de las hojas sometidas a 24 μM Cu, el Fe y el Ni se localizan mayoritariamente en la epidermis superior (Figs. 19B-21B), mientras que la pared celular, es el tejido que da menores % de Fe y Ni, presentando el resto de tejidos valores similares (Figs. 19D-21D). En cuanto a la distribución de Zn, es la epidermis inferior seguido del parénquima lagunar las regiones de las hojas que acumulan una mayor cantidad de este metal (Figs. 20B-20D). Como ocurre en altramuza, no se ha detectado Fe, Zn y Ni ni en el citoplasma-vacuola ni en las paredes celulares de los tejidos de raíz analizados.

Por otro lado, la microlocalización de P, K y Mg en los distintos tejidos celulares de las hojas y raíces de las plantas de altramuza y soja tratadas con 1,6 y 24 μM de Cu, se muestra en las Figs. 22-24. En las hojas de altramuza, la dosis más alta de Cu (24 μM), reduce de forma significativa el % de señal de P presente en las vacuolas y pared de las células del tejido epidérmico, mientras que no varía con respecto al control, el detectado en el tejido vascular y en las células del mesófilo (Figs. 22A-22C). Sin embargo, aumenta en el interior de las células del córtex externo de la raíz y no se observan diferencias significativas en el córtex externo y cilindro central.

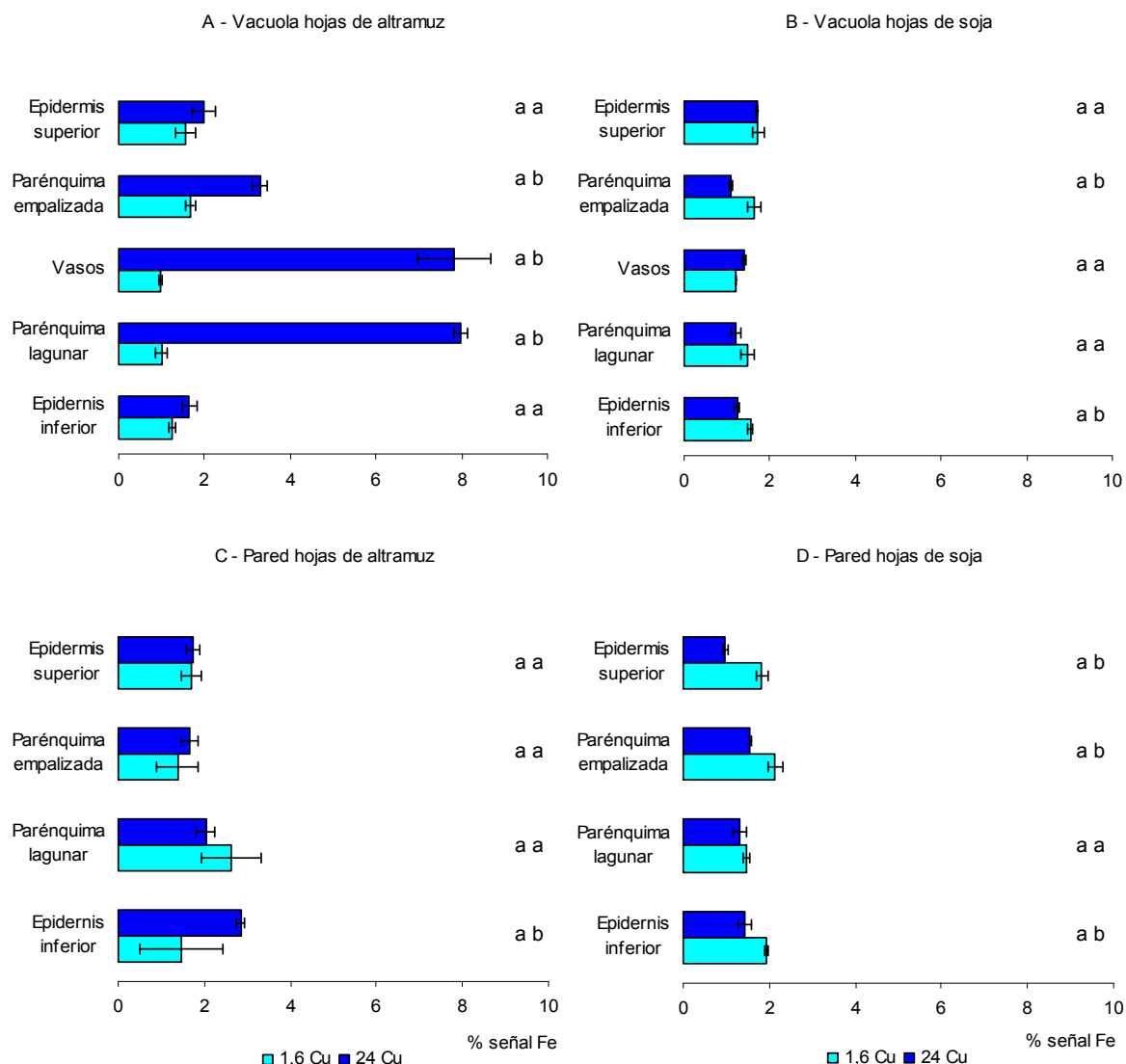


Fig. 19. Localización de Fe en secciones de hojas de plantas de altramuz (A y C) y soja (B y D) tratadas con 1,6 μM Cu y 24 μM Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$)

Con respecto al K, en general el exceso de Cu provoca un descenso del % encontrado en las paredes celulares y vacuolas de las células que forman los distintos tejidos foliares de altramuz (Figs. 23A-23C). En raíz, no afecta al % de K en el interior de las células del córtex externo, pero reduce de forma significativa detectado en el córtex interno y cilindro central (Fig. 23E). En cuanto al % de Mg en hojas, se observa algo similar a lo comentado para el K (Figs. 24A-24C). En raíz de altramuz, el aporte de la dosis más alta de Cu disminuye el % de Mg presente en el citoplasma de las células

del córtex externo, mientras que aumenta el depositado en las otros das secciones analizadas (Fig. 24E).

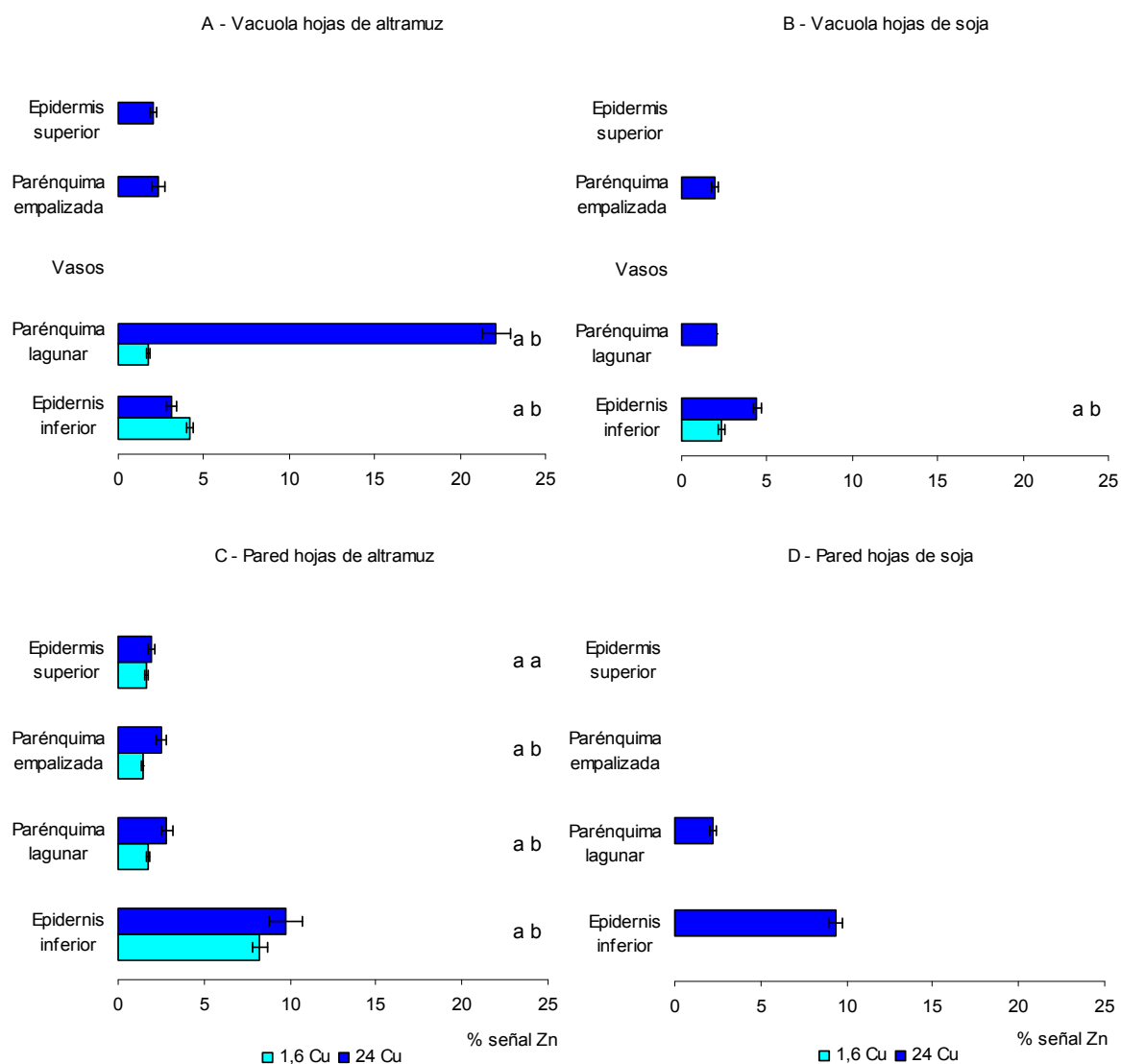


Fig. 20. Localización de Zn en secciones de hojas de plantas de altramuz (A y C) y soja (B y D) tratadas con 1,6 μ M Cu y 24 μ M Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$)

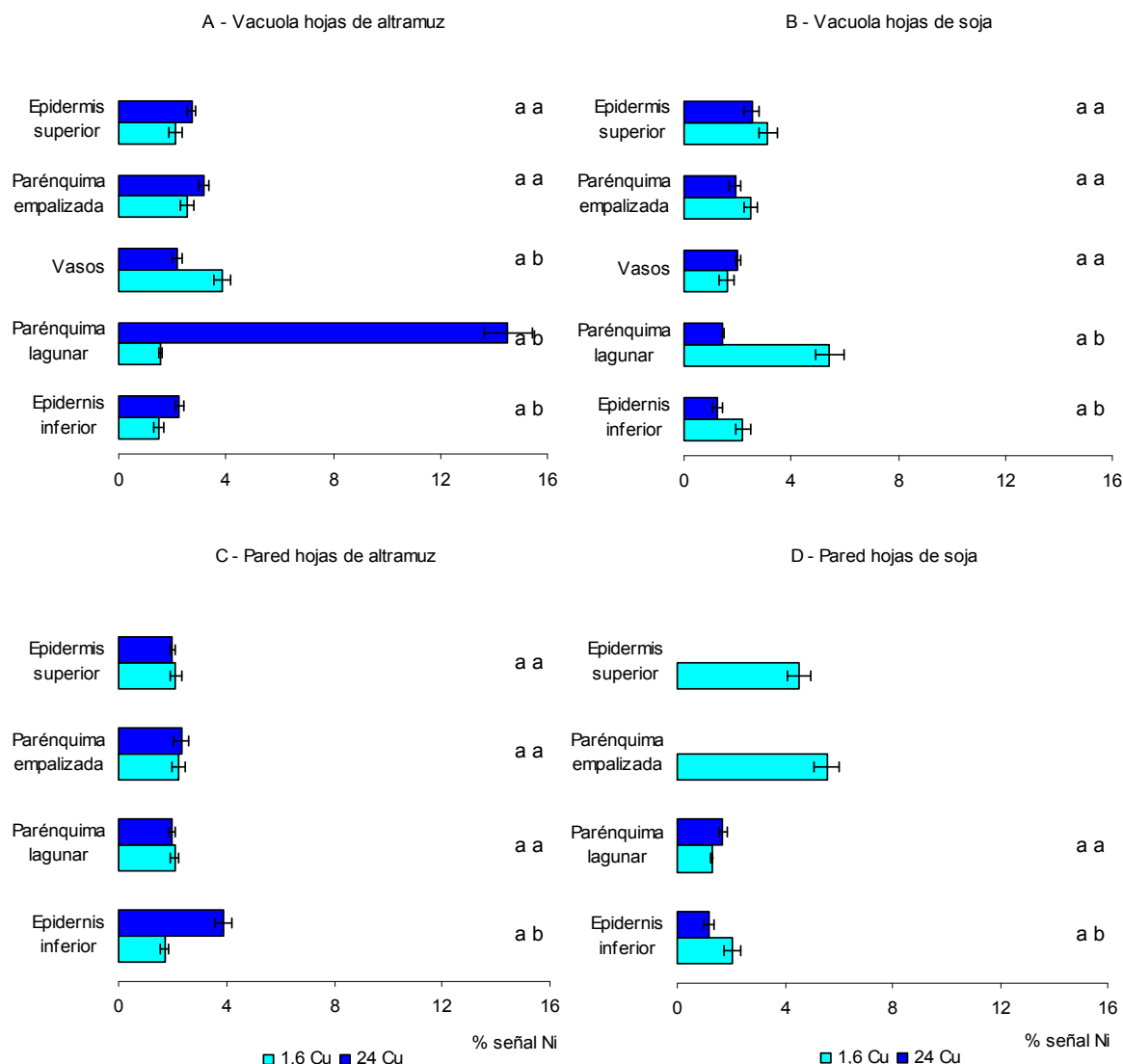


Fig. 21. Localización de Ni en secciones de hojas de plantas de altramuz (A y C) y soja (B y D) tratadas con 1,6 μM Cu y 24 μM Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$)

En la planta de soja, el suministro de 24 μM de Cu casi no afecta al % de señal de P encontrado en las vacuolas de las células que forman los distintos tejidos de las hojas, pero reduce el % detectado en las paredes celulares de estos tejidos (Figs. 22B-22D). En raíz al aumentar el aporte de Cu, lo hace la señal de K en el citoplasma de las células de la rizodermis y en el córtex, pero disminuye en el cilindro central (Fig. 22F). En las hojas de soja tratadas con la dosis más alta de Cu, el % de señal de K en el interior de las células de los distintos tejidos, disminuye con respecto al control. En raíz, el exceso de Cu provoca un descenso de la cantidad de K acumulado en la

rizodermis y córtex externo, en cambio, aumenta el depositado en los tejidos más internos (Fig. 23F). En cuanto a la señal de Mg en las hojas de las plantas control y las tratadas con 24 μ M de Cu, no se observan diferencias significativas en las vacuolas de las células en los distintos tejidos celulares (Figs. 24B-24D). En pared celular, la dosis más alta de Cu aumenta el % de Mg localizado en la epidermis superior, mientras que lo reduce en el resto de los tejidos. En la raíz se observa lo contrario (Fig. 24F).

En las hojas de altramuz, P y K se acumulan mayoritariamente en las vacuolas de las células del tejido epidérmico en ambas dosis de Cu aplicadas. En cambio, el Mg se localiza fundamentalmente en los vasos internos y parénquima lagunar. En la pared de las células se detecta un gradiente decreciente de P, K y Mg desde la epidermis superior hacia la inferior. Algo similar se aprecia en las vacuolas de las células de la raíz, donde los % de señal de P y K decrecen desde el córtex externo al cilindro central (Figs. 22 y 23). En cuanto al Mg, la pauta de localización en raíz varía en función de la dosis de Cu aportada, siendo mayor el % de Mg localizado en el córtex externo para las plantas control y en el cilindro central para las tratadas con las dosis más alta de Cu (Fig. 24).

En soja, el P se acumula principalmente en el citoplasma de las células de la epidermis superior; detectándose una tendencia descendente desde la epidermis inferior hacia la superior. En cambio en la pared se distribuye por igual entre todos los tejidos estudiados (Figs. 22B-22C). El K en las hojas, se localiza mayoritariamente en la pared celular y en el citoplasma de las células de mesófilo (Figs. 23B-23C). El Mg, se localiza en las vacuolas de las células del parénquima lagunar y vasos, así como en la pared celular de la epidermis superior y parénquima en empalizada (Figs. 24B-24D). En la raíz, las pautas de localización de P, K y Mg varían con la dosis de Cu aportada.

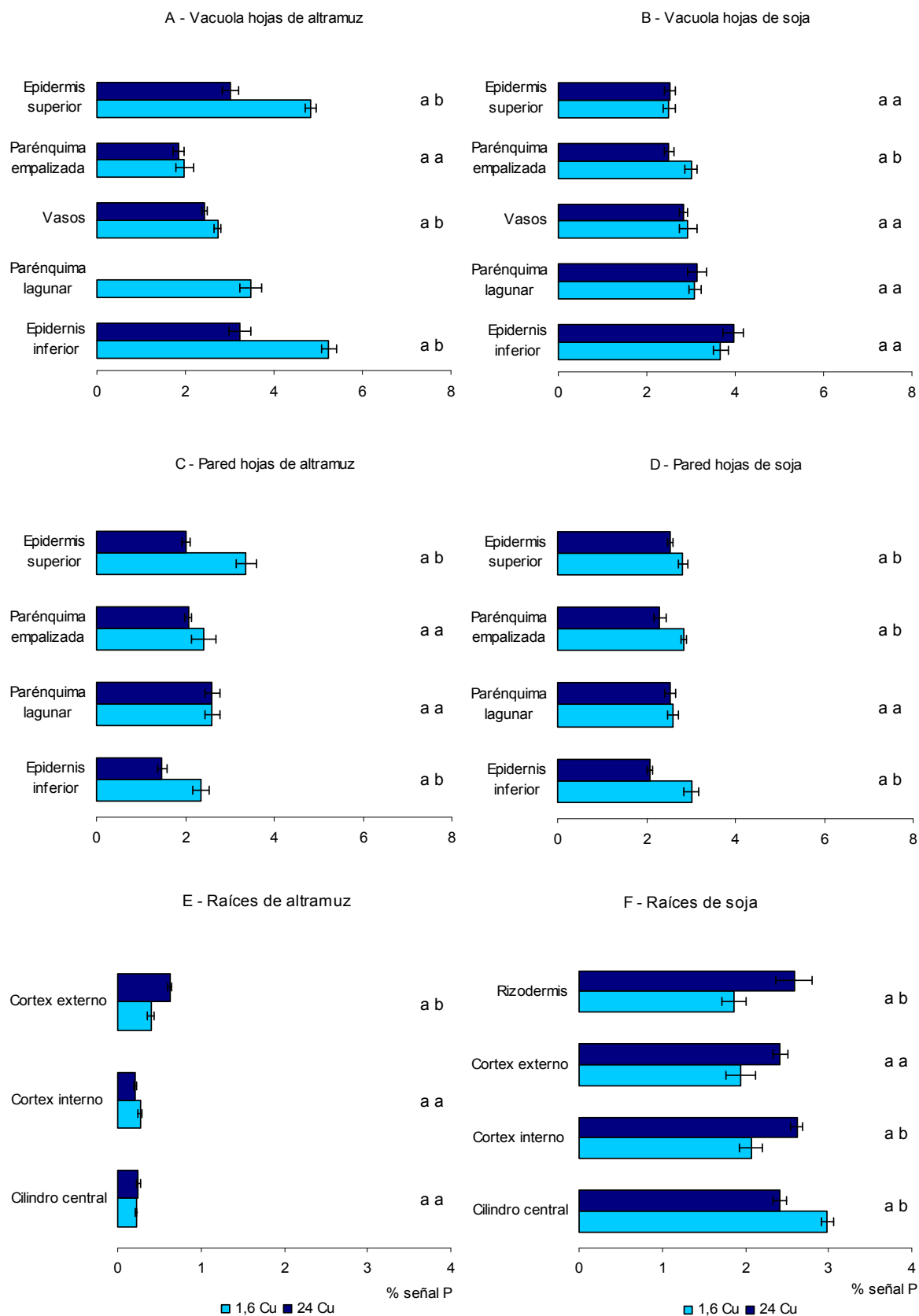


Fig. 22. Localización de P en secciones de hojas y raíces de plantas de altramuz (A, C y E) y soja (B, D y F) tratadas con 1,6 y 24 μ M Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$)

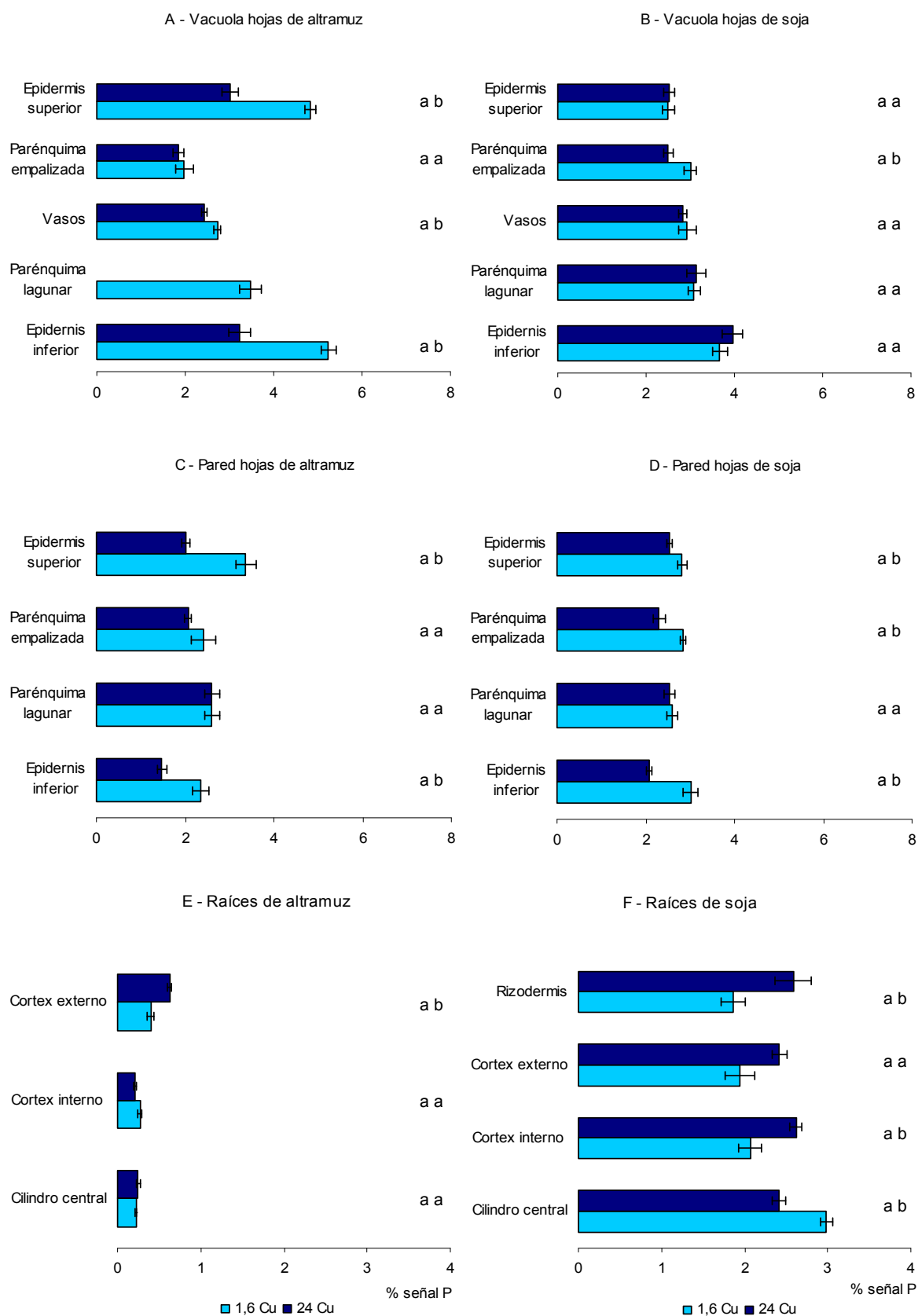


Fig. 23. Localización de \underline{K} en secciones de hojas y raíces de plantas de altramuz (A, C y E) y soja (B, D y F) tratadas con 1,6 y 24 μM Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$)

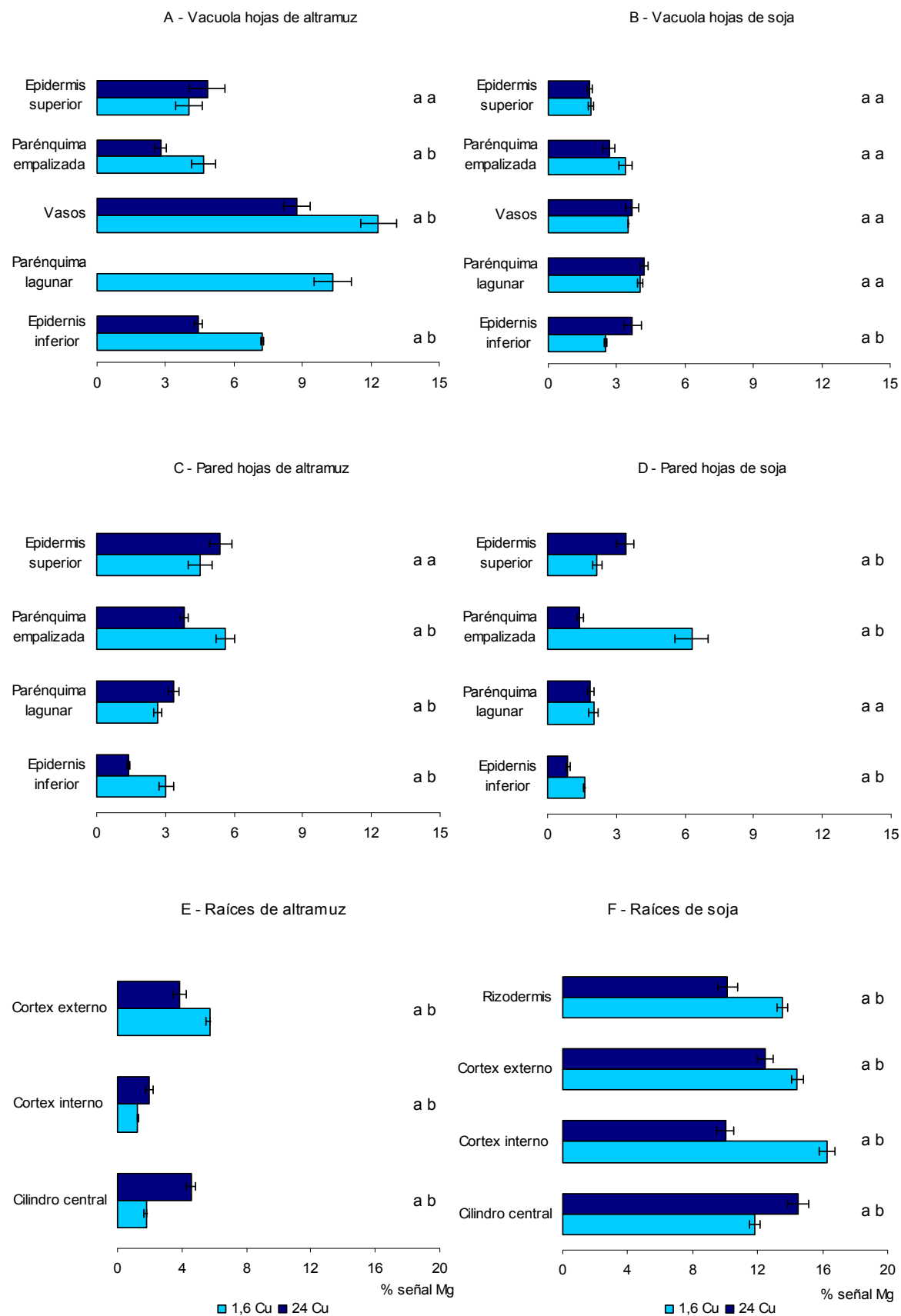


Fig. 24. Localización de Mg en secciones de hojas y raíces de plantas de altramu (A, C y E) y soja (B, D y F) tratadas con 1,6 y 24 μ M Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$)

2.- Discusión de fraccionamiento y localización subcelular de Cu en plantas de altramuz y soja

La mayoría de las plantas que crecen en medios contaminados por MPs desarrollan fundamentalmente, dos tipos de estrategias frente a ellos. Una sería restringiendo su absorción y transporte, y la otra, incluiría procesos de acumulación, básicamente por compartimentación en orgánulos, como las vacuolas o recurriendo a la complejación del MP con ligandos orgánicos, como aminoácidos, ácidos orgánicos o péptidos (Clemens, 2001; Hall, 2002). A nivel global también existen diferencias inter-específicas importantes; así hay especies vegetales que son capaces de acumular grandes cantidades de MPs en la parte aérea (Brooks, 1998), mientras que otras lo hacen básicamente en la parte subterránea de la planta (Chatterjee y Chatterjee, 2000).

Del análisis de los resultados de los capítulos anteriores, se deduce que tanto el altramuz como la soja parecen bastante sensibles al exceso de Cu en el medio. Si bien, ambas leguminosas exhiben respuestas ligeramente distintas frente al estrés de Cu. Así, la planta de altramuz parece más sensible que la de soja, a pesar de acumular esta última especie, una mayor cantidad de Cu en sus tejidos. Lo cual podría estar relacionado, entre otras cosas, con la existencia de diferencias en los procesos de compartimentación celular y subcelular. Por tanto, el conocimiento de las pautas de distribución de Cu u otro MP en las células y tejidos, podría proporcionar una información esencial sobre las distintas estrategias de bioacumulación que desarrollan los vegetales, tal como sugieren diversos autores (Liu y col., 2004; Ke y col., 2007; Liu y col., 2009).

En la última década, se han empleado distintos métodos para estudiar la localización del Cu en los tejidos y órganos vegetales. Entre ellos se encuentran espectroscopía electrónica por pérdida de energía (EELS; Barceló y Poschenrieder 1999; Liu y col., 2004; Rau y col., 2006), técnicas de microsonda con radiación sincrotrón y fluorescencia de rayos X (Shi y col., 2004), espectrometría de energía

dispersiva de rayos X (EDXS; [Ni y col., 2005](#)) y la técnica de centrifugación diferencial ([Liao y col., 2004](#); [Ke y col., 2007](#)). En este trabajo, se ha utilizado la centrifugación en gradiente para determinar la concentración y la distribución subcelular de Cu en diversos órganos de plantas de altramuza y soja tratadas con 1,6 y 24 μM Cu. Si bien esta metodología, no excluye la posibilidad de que se produzca una redistribución de los elementos durante la etapa de preparación de las muestras como observan diversos autores ([Ke y col., 2007](#); [Liu y col., 2009](#); [Dandan y col., 2011](#)). Por ello para estudiar los patrones de localización subcelular de Cu y verificar los resultados cuantitativos obtenidos mediante la metodología anterior, se ha recurrido a un método no invasivo basado en microscopía electrónica de barrido a baja temperatura y dispersión de rayos X (LTSEM-EDXMA).

Por otro lado, la raíz actúa como una barrera de defensa frente a los MPs, almacenando gran parte del contaminante y evitando así el transporte a la parte aérea, donde su efecto es más perjudicial ([Prasad, 2004](#)). Dentro de la raíz, las paredes celulares constituyen una barrera, donde se acumulan gran parte de los metales, como lo ponen de manifiesto estudios de localización de Al ([Marienfeld y col., 1995](#)), Cd ([Vázquez y col., 2007](#); [Wang y col., 2008](#)), Cr ([Liu y col., 2009](#)), Pb y Zn ([MacFarlane y Burchett, 2000](#)). De esta manera, las paredes celulares de las raíces actúan como un buffer para los MPs, ya que contienen proteínas, celulosa, hemicelulosas y ligninas; las cuales presentan un elevado número de ligandos (grupos hidroxilos, carboxilos, aminos, aldehídos, fosfatos, tioles, etc.) que pueden participar en reacciones de intercambio, adsorción, complejación, precipitación y cristalización, secuestrando y restringiendo su transporte a través de las membranas e impidiendo el contacto directo con los orgánulos citoplasmáticos ([Mullen y col., 1992](#); [Neumann y col., 1995](#)).

En este trabajo, se ha observado que cuando aumenta la dosis de Cu en el medio, se exalta la concentración de Cu en la pared celular de las raíces de ambas leguminosas ([Figs. 1C y 2C](#)). Aunque con la misma dosis de Cu (24 μM), las de soja acumulan más Cu en las paredes de las células que las de altramuza. En cambio, las

raíces de soja presentan una menor concentración de Cu soluble y en los orgánulos que las de altramu. Además en ambas leguminosas, con independencia de la dosis de Cu, más del 65% del Cu se encuentra localizado en la pared celular de las raíces (Figs. 3 y 4). En otras especies vegetales, más del 50% del Cu presente en las raíces se encuentra unido a la pared celular, como se ha observado en helechos (Sela y col., 1988), *Athyrium okosense* (Nishizono y col., 1989), césped (Iwasaki y col., 1990), *Elscholtzia haichowensis* (Lou y col., 2004), *Elscholtzia splendens* (Peng y col., 2005), girasol (Cathala y Salsac, 1975), trébol rojo (Iwasaki y col., 1990) y maíz (Cathala y Salsac, 1975). Por el contrario, en ajo (Liu y Kottke, 2004) y arroz (Lindon y Henriques, 1998), el Cu se localiza fundamentalmente en las vacuolas. Estas diferencias pueden ser atribuidas a las dosis de Cu aplicadas y al diferente comportamiento de cada especie vegetal frente al exceso de Cu (He y col., 2008).

Los resultados de microlocalización de Cu en los tejidos de la raíz, revelan que en soja, el Cu se localiza principalmente en la rizodermis y en el córtex externo, observándose un gradiente decreciente de Cu desde el exterior al interior de la parte subterránea de la planta (Fig. 18). Un gradiente creciente de Cu encuentra Vesik (1998) en raíces de *Eichhornia crassipes* tratadas con Cu, mientras que Vázquez y col. (2007) observan una localización decreciente de Cd en raíces de altramu. Otros autores (MacFarlane y Burchett, 2000) encuentran en *Avicennia marina* que la concentración de Cu se mantiene constante entre la rizodermis y la endodermis.

Por otro lado, cuando la dosis de Cu aportada a las plantas es baja (1,6 μM), las hojas de altramu acumulan el Cu, casi a parte iguales, entre la pared celular, soluble y orgánulos (Figs. 1, 3A y 3C), mientras que en las hojas de soja (Figs. 2, 4A y 4C), el Cu contenido en los orgánulos es un 80% más bajo que en altramu. Bajo estrés por Cu, aumenta la localización de Cu en todas fracciones de las hojas de altramu, pero especialmente en la soluble (Figs. 3B y 3D). Las hojas de soja, ante un exceso de Cu, reaccionarían aumentando la concentración de Cu en todas las fracciones, aunque con especial intensidad en la correspondiente a los orgánulos (Figs. 4C y 4D).

La fracción soluble está constituida mayoritariamente por el Cu contenido en el citosol y la vacuola (Chen y col., 2005; Liu y col., 2009). Para asegurar un funcionamiento normal del metabolismo celular, la concentración de los MPs en el citosol debe ser más baja que en la vacuola, jugando por tanto este orgánulo un importante papel los procesos de detoxificación y homeostasis (Hall, 2002). Algunos autores han detectado en las hojas de ciertas especies, un mayor acumulo de los metales en esta fracción, y más concretamente en las vacuolas, como es el caso del Cd en altramuz (Vázquez y col., 2007), Cr en *Leersia hexandra* (Liu y col., 2009), Mn en cebada (Wu y col., 2007), Ni en *Thlaspi caerulescens* (Frey y col., 2000) y *Thlaspi goesingense* (Krämer y col., 2000) y Zn en *Thlaspi caerulescens* (Vázquez y col., 1992; Küpper y col., 1999). Con respecto al Cu, resultados similares se han observado en *Armenia marina* (Neumann y col., 1995) y *Enteromorpha flexuosa* (Andrade y col., 2004), donde la mayor parte del Cu se encuentra localizado en las vacuolas, unido a fenoles, polipéptidos y fitoquelatinas. Por el contrario, en *Avicennia marina* (MacFarlane y Burchett, 2000), *Azolla* (Sela y col., 1988), *Daucus carota* (Ke y col., 2007) y *Elsholtzia splendens* (Peng y col., 2005) se deposita mayoritariamente en la pared celular. Lindon y Henriques (1998) observan que las vacuolas no juegan un papel muy importante en la detoxificación del Cu en plantas de arroz.

Por otro lado, en los tejidos que forman las hojas de altramuz, el exceso de Cu se localiza mayoritariamente en el citoplasma-vacuola de las células del parénquima lagunar y en la pared celular de la epidermis inferior (Figs. 17A-17C). En las hojas de soja, el Cu se localiza tanto en el simplasto como en el apoplasto de las células de la epidermis abaxial, observándose, además un gradiente decreciente de Cu desde la epidermis inferior a la superior (Figs. 17B-17D). En *Cannabis sativa*, el Cu se localiza fundamentalmente en la epidermis superior y en los tricomas de la epidermis abaxial (Arru y col., 2004), mientras que en *Avicennia marina* (MacFarlane y Burchett, 2000) y *Elsholtzia splendens* (Shi y col., 2004) lo hace mayoritariamente en el tejido vascular, seguido del mesófilo y del tejido epidérmico.

A su vez, el exceso de Cu provoca variaciones en la concentración, así como en la distribución de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Ni a nivel celular y subcelular en ambas especies estudiadas. En general, el aporte de 24 μM de Cu, reduce la concentración de Fe en todas las fracciones subcelulares de las hojas de altramuza y soja, pero la incrementa en raíz; siendo este hecho más significativo en la última especie mencionada. Resultados similares se han detectado al estudiar el efecto del exceso de Cu sobre la concentración total de Fe en las hojas y raíces de ambas leguminosas (Capítulo IV). [Hernández y col. \(1998\)](#) observaron un aumento de la concentración de Fe en la fracción soluble y en los orgánulos de las hojas y raíces de plantas de guisante y maíz expuestas al Cd.

A nivel subcelular, el Fe se localiza mayoritariamente en los orgánulos de las hojas de altramuza, casi un 60% en los de las adultas y un 50% en los de las jóvenes ([Fig. 5](#)). En las hojas de soja, la fracción mayoritaria de Fe es la pared, con un 50% en las hojas viejas, mientras que en las nuevas, los % más altos de Fe están en los orgánulos ([Fig. 6](#)). En las hojas de ambas leguminosas, el exceso de Cu reduce los % anteriores. En las raíces, el estrés por Cu causa una redistribución del Fe, disminuye en la pared y aumenta en los orgánulos ([Figs. 5 y 6](#)). A nivel de tejidos, el Fe se localiza principalmente en los vasos y en el parénquima lagunar en las hojas de altramuza, mientras que en soja se deposita en el tejido epidérmico ([Fig. 19](#)). El exceso de Cu, causa una acumulación de Fe en las vacuolas de las células de los tejidos foliares. En las hojas de soja, no se observa ningún efecto del Cu sobre la microlocalización de Fe. Las raíces de soja acumulan una menor cantidad de Fe que las de altramuza, por lo que esta última exporta más Fe que la de soja.

Con respecto al Mn, el exceso de Cu aumenta la concentración de este metal en todas las fracciones subcelulares de las hojas y raíz de altramuza y soja. [Shi y col. \(2004\)](#) detectaron una correlación positiva Cu-Mn en las hojas de *Elsholtzia splendens*. Otros MPs, como el Cd reduce la tasa de acumulación de Mn en todas las fracciones subcelulares de hojas y raíces de guisante y maíz ([Hernández y col., 1998](#)). Asimismo, el Cd promueve en cebada, una reducción del Mn soluble y del localizado

en las paredes celulares de las hojas, así como en todas las fracciones subcelulares de la raíz (Wu y col., 2007).

En este trabajo, la dosis más alta de Cu apenas modifica la distribución subcelular de Mn en las dos leguminosas estudiadas. Si bien, en las hojas de altramuz el Mn se localiza principalmente en los cloroplastos, mientras que las hojas de soja y en las raíces de ambos cultivos el sitio preferente son las paredes celulares (Figs. 7 y 8). Según Hernández y col. (1998), el Mn se localiza mayoritariamente en la pared celular de hojas y raíces de guisante y maíz cultivados con y sin Cd. Sin embargo, Wu y col. (2007) observan en cebada una gran acumulación de Mn en la fracción soluble de las hojas y en la pared celular de las raíces.

En el capítulo anterior, se ha observado un aumento de la concentración total de Zn en hojas y raíces de altramuz y soja a medida que aumenta la dosis de Cu. En este estudio el exceso de Cu provoca a nivel subcelular, un incremento de la concentración del metal en la fracción soluble de las hojas de altramuz y un descenso en la pared celular y en los orgánulos. En cambio en soja, la aumenta en todas las fracciones analizadas. Con respecto a la raíz, también se detectan diferencias entre las especies estudiadas. En altramuz, la dosis más alta de Cu reduce la concentración de Zn en las paredes celulares y la aumenta en los orgánulos, mientras que en soja produce lo contrario. Wu y col. (2005), observaron que al exponer a plantas de cebada a estrés por Cd, disminuía la concentración de Zn en todas las fracciones subcelulares de las raíces y hojas; excepto en los cloroplastos que lo aumentaba ligeramente.

A su vez, el fraccionamiento del Zn en las hojas pone de manifiesto grandes diferencias entre los dos cultivos; así, las hojas de altramuz almacenan mayoritariamente el Zn en los orgánulos, mientras que las de soja lo hacen en las paredes celulares (Figs 9 y 10). A nivel tisular, el Zn se localiza principalmente en la epidermis inferior y en el parénquima en empalizada de las hojas de ambos cultivos con independencia de la dosis de Cu aportada (Fig. 20). En raíz, se observan grandes diferencias inter-específicas, ya que en altramuz casi un 55% del Zn está localizado en

las paredes celulares, mientras que en soja más del 60% se encuentra en los orgánulos (Figs. 9 y 10). El exceso de Cu, reduce considerablemente el % de Zn soluble en la raíz, aumentando el % de Zn localizado en membranas y orgánulos de altramuz y, especialmente, el Zn depositado en las paredes de las células radicales de soja. Según Wu y col. (2005) el Zn, con independencia de la dosis de Cd aplicada a plantas de cebada, se acumula en la pared celular en las hojas y en la fracción soluble de las células de la raíz.

La dosis más alta de Cu, provoca un descenso de la concentración de Ni total en las hojas de altramuz y soja (Capítulo IV). Desde el punto de vista subcelular, el exceso de Cu incrementa de forma general el nivel de Ni en la vacuola y la pared celular de altramuz, en cambio lo reduce en soja (Fig. 21). Si bien, es el parénquima lagunar el tejido que acumula mayoritariamente el Ni en altramuz, mientras que en la soja, es en las células del mesófilo donde se deposita este metal.

El aporte de 24 μM Cu reduce la señal de P en el simplasto y apoplasto de las hojas de altramuz, mientras que en soja lo reduce en la pared celular (Fig. 22). Esto coincide con lo encontrado en el capítulo IV, en el cual se ha observado un descenso en la concentración total de P en las hojas de altramuz y soja tratadas con exceso de Cu. Shi y col. (2004) hallaron una correlación positiva Cu-P en las hojas de *Elsholtzia splendens*, lo cual sugiere que el P podría jugar un papel importante en la acumulación de Cu en esta planta. En cambio, Coccozza y col. (2008) observaron un descenso de P en tejidos radiculares de *Populus alba* tratada con Cd.

La concentración de K en los orgánulos de las hojas de altramuz tratadas con la dosis más alta de Cu (24 μM) se reduce ostensiblemente en comparación a los valores de las plantas control. Por el contrario, se observa una acumulación de K en todas las fracciones subcelulares de las hojas de soja. En el capítulo IV, también se había observado un descenso de la concentración total de K en hojas de altramuz cultivadas con exceso de Cu, en cambio, no se vieron variaciones en las de soja. Además, las hojas de esta última especie vegetal tienen el doble de K soluble y el triple en las paredes celulares que las de altramuz. En altramuz, los cloroplastos son los únicos

orgánulos que contienen K. En las hojas de soja, además de en los cloroplastos, también se detecta K en el resto de orgánulos.

Con respecto a la distribución subcelular del K, se ha observado que en ambas especies y dosis de Cu aplicadas, el K se acumula mayoritariamente en la fracción soluble de las células de las hojas y de la raíz (Figs. 11 y 12). Por el contrario, se han detectado diferencias en cuanto a la localización del K en los distintos tejidos de las hojas entre ambas leguminosas, presentando la planta de altramuz un mayor nivel de este nutriente en la epidermis superior y parénquima en empalizada, mientras que en la soja tiene lugar en el parénquima lagunar. En cuanto a la raíz, cabe destacar que no se han observado grandes diferencias entre ambos cultivos desde el punto de vista de la localización subcelular, siendo la fracción mayoritaria de K la soluble. Los resultados del microanálisis en raíz, muestran que en altramuz el K se localiza principalmente en el córtex externo, mientras que en la raíz de soja lo hace en zonas más internas del cilindro cortical (Fig. 23).

El aumento de la dosis de Cu, reduce la acumulación de Ca en los orgánulos de las hojas de altramuz, mientras que en las hojas de soja se observa el efecto contrario (Figs. 13 y 14). En las raíces de altramuz, el exceso de Cu exalta la cantidad de Ca en los orgánulos y en soja se observa un comportamiento similar, pero menos intenso. Las plantas de altramuz localizan mayoritariamente el Ca en los orgánulos de las hojas y en las paredes celulares de la raíz. En soja, el Ca se encuentra principalmente en las paredes celulares de las hojas, mientras que en las raíces se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble.

Cuando los cultivos se realizan con una dosis elevada de Cu, en las hojas de altramuz se reduce la contribución del Ca en membranas y orgánulos, pero aumenta el % de Ca soluble. En las hojas de soja, no se ve una tendencia definida. En las raíces de ambos cultivos, la dosis más elevada de Cu aumenta la concentración de Ca en la pared celular y en orgánulos, pero no altera la cantidad de Ca soluble. Al comparar los datos de concentración de Ca entre ambas leguminosas se pone de manifiesto el

carácter calcífugo de la planta de altramuza. Ya que el Ca localizado en las paredes celulares foliares es $\frac{1}{3}$ inferior a los % que ofrecen las hojas de soja.

El aumento de la dosis de Cu, no causa ningún efecto en la concentración de Mg presente en las fracciones subcelulares, mientras que en soja, acentúa la acumulación de Mg en la fracción soluble y en las paredes celulares. Por el contrario, produce un descenso del elemento presente en la pared y en la fracción soluble de las raíces de altramuza, así como en los orgánulos en soja (Figs. 15 y 16). Las plantas de altramuza tratadas con 1,6 μ M de Cu, localizan mayoritariamente el Mg en la fracción soluble de las hojas y en la pared de la raíz. En soja, se encuentra principalmente en la fracción soluble de las hojas y de la raíz. Cuando se lleva a cabo el cultivo con exceso de Cu, en las hojas de altramuza no se observa ningún efecto, mientras que en las raíces disminuye el Mg localizado en las paredes celulares y en orgánulos.

En las hojas de soja, se intensifica la acumulación de Mg soluble y del localizado en la pared celular, mientras que en raíz se reduce el Mg soluble y en orgánulos. Con independencia de la dosis de Cu, la mayor parte del Mg en orgánulos corresponde a los cloroplastos, sin embargo, en soja el Mg se encuentra en el resto de los orgánulos y membranas. En raíz, se observa lo contrario, se acumula en los orgánulos en altramuza y en los leucoplastos en soja. A nivel de tejidos, el Mg se deposita en las células de mesófilo y en los vasos en altramuza, mientras que en soja se localiza primordialmente en el mesófilo (Fig. 24).



Capítulo VI

1.- Resultados del efecto del Cu sobre el desarrollo y funcionamiento de plantas noduladas de altramuza y soja

1.1. Cobre retenido por el sustrato de cultivo

Para evaluar el % de Cu disponible para las plantas, así como el adsorbido por el sustrato de cultivo (perlita) se realizó un experimento de incubación en laboratorio con 1,6, 48, 96 y 192 μM de Cu y cuyos resultados se muestran en la Fig. 1. La fracción soluble y la desorbida por el sustrato se ha considerado como una única fracción, la cual se ha denominado disponible. El % de Cu disponible disminuye significativamente con la dosis de Cu, con reducciones en comparación al control (1,6 μM) del 82%, 76% y 71% para las dosis de 48, 96 y 192 μM Cu, respectivamente. Por el contrario, el % de Cu retenido por la perlita aumenta a medida que lo hace la dosis de Cu. Al aportar 48 μM Cu, aproximadamente el 18% del metal es adsorbido por la perlita, mientras que al aplicar 96 y 192 μM Cu el sustrato retiene un 24% y 29% del Cu, respectivamente.

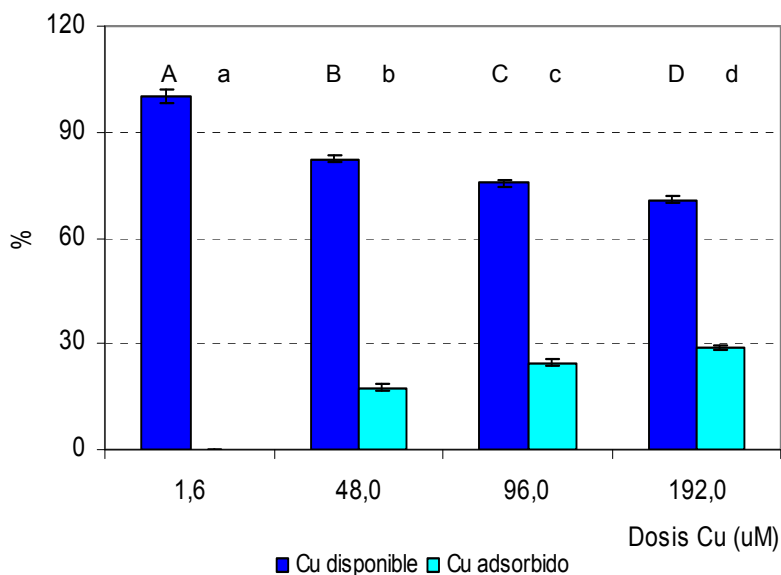


Fig. 1. Porcentajes de Cu adsorbido y el disponible para las plantas. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). Encima de las barras se muestran los resultados del test de Duncan ($P < 0,05$); Cu disponible, letras mayúsculas y Cu adsorbido, letras minúsculas

1.2. Parámetros relacionados con la nodulación y fijación de N₂

Diversos valores relacionados con la biomasa de nódulos en plantas noduladas de altramuiz y soja cultivadas con dosis crecientes de Cu (1,6, 48, 96 y 192 μ M) se muestran en la [Tabla 1](#). En altramuiz, el número y peso de nódulos se reducen de forma significativa a medida que aumenta la dosis de Cu. En comparación a los valores del tratamiento control, el peso medio de los nódulos sólo aumenta significativamente en el tratamiento 192 μ M Cu. La situación opuesta la muestra el contenido de proteínas solubles en los nódulos. En comparación a los valores del control, la fijación específica de nitrógeno (SNF) se reduce significativamente para las dosis de 96 y 192 μ M Cu.

En soja, el suministro de 48 μ M Cu, no causa ninguna modificación sobre los parámetros analizados, salvo en la SNF que la reduce un 17% en comparación al tratamiento control. En cambio, el aporte de 96 μ M Cu disminuye el número y peso de nódulos ([Tabla 1](#)). Las plantas de soja sometidas a 192 μ M Cu presentan un número de nódulos similar a las tratadas con 96 μ M Cu, pero una menor biomasa. Con respecto al peso medio y la concentración total de proteínas solubles del nódulo, sólo la dosis 192 μ M de Cu promueve un descenso significativo en relación al control.

Por otro lado, el N fijado se ha calculado como la diferencia entre el contenido de N a los 35 y 0 días de tratamiento. Los contenidos de N en vástago, raíz y total de altramuiz y soja se muestran en la [Tabla 2](#). A medida que aumenta la dosis de Cu en el medio, el contenido de N en el vástago de altramuiz se reduce significativamente. En el vástago de soja, también disminuye, pero las plantas de los tratamientos 96 y 192 μ M presentan valores similares entre ellas. El contenido de N en las raíces de altramuiz no se ve afectado por la dosis de Cu; mientras que en las de soja aumenta ligeramente a medida que lo hace el aporte de Cu. La cantidad de N total fijado por las plantas de altramuiz experimenta disminuciones significativas por efecto de la dosis de Cu. En soja, las plantas cultivadas con 1,6 y 48 μ M exportan cantidades similares de N total, aunque mayores que las sometidas a 96 y 192 μ M.

Tabla 1. Efecto de la dosis de Cu sobre la nodulación de altramuz y soja tras 35 días de tratamiento. Los datos son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

	Dosis Cu (μM)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Nº nódulos planta ⁻¹	34,7 \pm 2,9 ^a	25,4 \pm 1,5 ^b	16,3 \pm 1,3 ^c	9,8 \pm 0,7 ^d
Peso nódulos (mg MF planta ⁻¹)	488,3 \pm 28,2 ^a	379,2 \pm 12,7 ^b	245,8 \pm 2,4 ^c	152,5 \pm 1,6 ^d
Peso medio (mg MF nº nódulos ⁻¹)	4,8 \pm 0,3 ^a	5,0 \pm 0,3 ^{ab}	5,0 \pm 0,3 ^{ab}	5,7 \pm 0,2 ^b
Proteína soluble nódulo (mg g ⁻¹ MF)	16,0 \pm 0,8 ^a	16,6 \pm 0,9 ^a	16,2 \pm 1,0 ^a	13,1 \pm 0,5 ^b
SNF (mg N asimilado mg MS nódulo ⁻¹)	0,45 \pm 0,03 ^a	0,42 \pm 0,01 ^{ab}	0,35 \pm 0,03 ^b	0,36 \pm 0,02 ^b
<i>Soja</i>				
Nº nódulos planta ⁻¹	13,8 \pm 0,7 ^a	12,7 \pm 0,7 ^a	7,7 \pm 0,3 ^b	7,6 \pm 0,2 ^b
Peso nódulos (mg MF planta ⁻¹)	265,6 \pm 9,7 ^a	91,7 \pm 18,7 ^a	155,6 \pm 7,5 ^b	113,3 \pm 7,2 ^c
Peso medio (mg MF nº nódulos ⁻¹)	6,5 \pm 0,3 ^a	7,7 \pm 0,6 ^b	6,8 \pm 0,2 ^{ab}	5,0 \pm 0,4 ^c
Proteína soluble nódulo (mg g ⁻¹ MF)	23,7 \pm 1,2 ^a	23,3 \pm 1,1 ^a	23,4 \pm 0,4 ^a	19,5 \pm 0,3 ^b
SNF (mg N asimilado mg MS nódulo ⁻¹)	0,76 \pm 0,05 ^a	0,63 \pm 0,03 ^b	0,61 \pm 0,04 ^b	0,60 \pm 0,02 ^b

Tabla 2. Efecto de la dosis de Cu sobre la exportación de N (mmol planta⁻¹) en plantas de altramuz y soja tras 35 días de tratamiento. Los datos son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

	Dosis Cu (μM)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Contenido de N en vástago	1,70 \pm 0,05 ^a	1,26 \pm 0,02 ^b	0,84 \pm 0,02 ^c	0,53 \pm 0,02 ^d
Contenido de N en raíz	0,23 \pm 0,01 ^a	0,25 \pm 0,02 ^a	0,26 \pm 0,02 ^a	0,23 \pm 0,02 ^a
Contenido total N	1,93 \pm 0,06 ^a	1,51 \pm 0,01 ^b	1,10 \pm 0,01 ^c	0,76 \pm 0,02 ^d
<i>Soja</i>				
Contenido de N en vástago	2,86 \pm 0,17 ^a	2,37 \pm 0,24 ^b	1,42 \pm 0,04 ^c	1,10 \pm 0,02 ^c
Contenido de N en raíz	0,28 \pm 0,01 ^a	0,43 \pm 0,04 ^b	0,36 \pm 0,05 ^{ab}	0,37 \pm 0,01 ^{ab}
Contenido total N	3,14 \pm 0,18 ^a	2,80 \pm 0,27 ^a	1,78 \pm 0,04 ^b	1,47 \pm 0,05 ^b

1.3. Concentración total y microlocalización de Cu en nódulos de altramuz y soja

Las concentraciones totales de Cu en los nódulos de altramuz y soja tratados con dosis crecientes de Cu (1,6-192 μM) se muestran en la Fig. 2. Los nódulos de

altramuz de las plantas cultivadas con 48, 96 y 192 μM Cu, dan concentraciones de Cu 6, 10 y 18 veces mayores, respectivamente, que los de las plantas del tratamiento control (1,6 μM Cu). En los nódulos de soja tratados con 48, 96 y 192 μM Cu, se observa una situación similar aunque más intensa, ya que los valores son 15, 36 y 68 veces más altos que los del control.

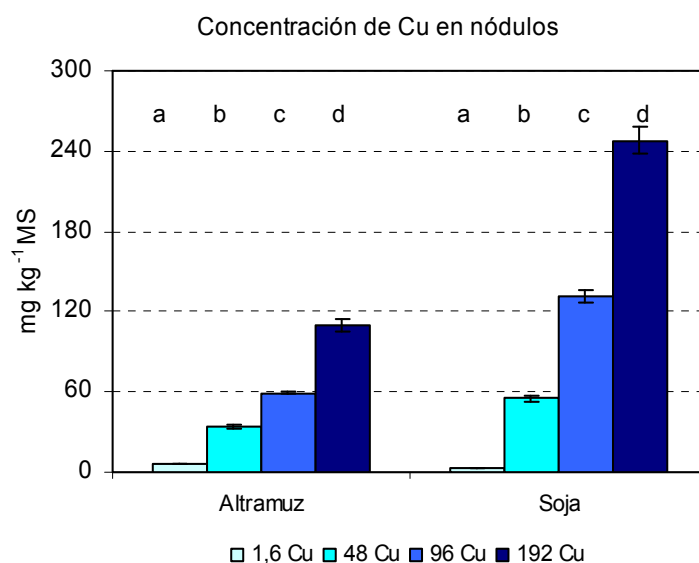


Fig. 2. Concentración de Cu en nódulos de altramuz y soja. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). Encima de las barras se muestran los resultados del *test* de Duncan ($P < 0,05$)

El microanálisis de Cu en nódulos de plantas de altramuz y soja tratadas con 1,6 y 192 μM de Cu se ha realizado mediante microscopía electrónica de barrido a baja temperatura y dispersión de rayos X (LTSEM-EDXMA). Los resultados se expresan como % de señal total y se muestran en la Fig. 3. En las vacuolas del córtex externo y medio de los nódulos de altramuz procedentes del tratamiento 192 μM Cu se observan unos % de señal de Cu más bajos que en los del tratamiento control. Lo contrario, se detecta en el córtex interno (19%), mientras que en la zona infectada no se observan diferencias entre ambos tratamientos (Fig. 3A). En la pared celular (Fig. 3C), el aporte de 192 μM Cu a los nódulos de altramuz reduce significativamente la señal de Cu en las zonas más externas del córtex nodular; en el córtex interno no se observan diferencias, mientras que en la zona infectada hay un aumento significativo

(36%). En las vacuolas y paredes celulares de los nódulos de soja del tratamiento control no se ha detectado Cu. Y tampoco en las paredes celulares de las células infectadas de los nódulos tratados con 192 μ M Cu. En el resto de paredes de las células del córtex se observa un gradiente decreciente en la señal de Cu desde el exterior hacia el interior de la corteza del nódulo (Figs. 3B-3D).

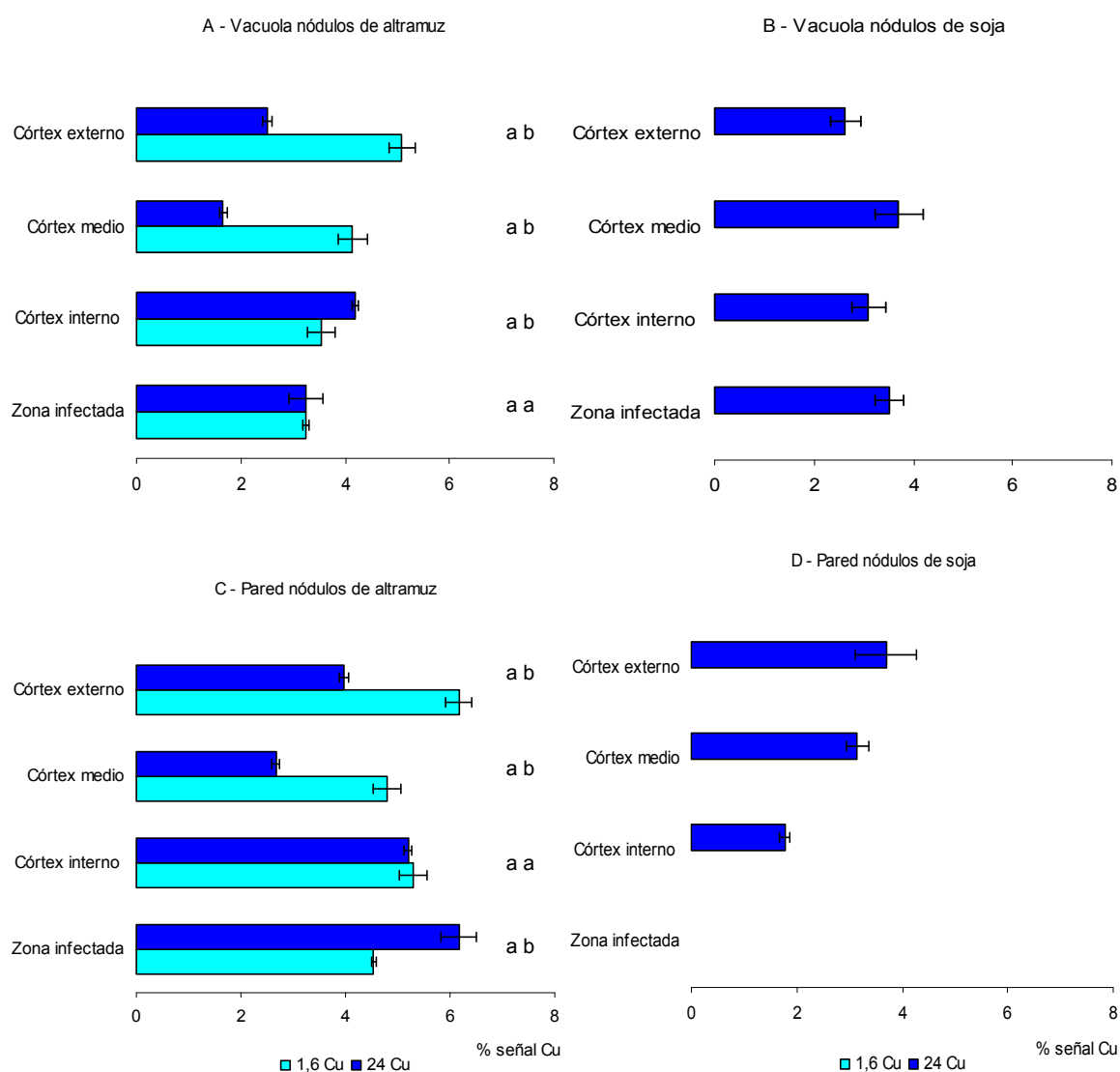


Fig. 3. Localización de Cu en secciones de nódulos de plantas de altramuz (A y C) y soja (B y D) tratadas con 1,6 y 192 μ M Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Distintas letras indican diferencias significativas en el ANOVA ($P < 0,05$)

1.4. Estructura y ultraestructura del nódulo

Para estudiar el efecto del exceso de Cu sobre la estructura de los nódulos de altramuz y soja se ha empleado microscopía óptica. Las dosis de Cu utilizadas han sido 1,6 y 192 μ M de Cu. Los nódulos de altramuz (Figs. 4A-4C) y soja (Figs. 5A-5C) cultivados con 1,6 μ M Cu muestran una estructura bien organizada, en los cuales se aprecian claramente dos regiones: la corteza y la zona infectada. En la corteza del nódulo maduro de altramuz se observan tres zonas perfectamente diferenciadas (Fig. 4): corteza externa (zona 1), media o parénquima nodular (zona 2) e interna (zona 3). La corteza externa o zona 1 está formada por cinco o seis capas de células con grandes espacios intercelulares y sin engrosamiento en las paredes celulares. Debajo se halla la corteza media o zona 2, la cual se está constituida por dos o tres capas de células de mayor tamaño, con paredes engrosadas en las zonas que rodean los espacios intercelulares, mientras que, el área de contacto entre células carece de engrosamiento. La zona 3 o corteza interna de los nódulos lupinoides corresponde a una zona indiferenciada entre “boundary layer” y la zona de distribución. Es una zona formada por dos o tres capas de células pequeñas, con espacios intercelulares pequeños y donde están situados los haces vasculares. En las zonas 2 y 3 ha sido visualizada la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno a la que nos hemos referido en la introducción. Finalmente, en la región central se encuentra la zona infectada, constituida exclusivamente por células infectadas repletas de simbiosomas. La estructura del nódulo lupinoide ha sido ampliamente descrita por de Lorenzo (1992) y Fernández-Pascual y col. (1992 y 2007).

Los nódulos de altramuz sometidos a 192 μ M Cu también presentan una buena organización estructural (Fig. 4B). Si bien, el exceso de Cu promueve algunas alteraciones en la corteza nodular así como en la zona infectada. En el córtex externo, las paredes celulares aparecen deformadas adquiriendo formas sinusoidales. En el córtex medio o zona 2, se produce un aumento del contenido de glicoproteínas y una oclusión de los espacios intercelulares, como se ha observado primeramente con la tinción con toluidina y, posteriormente, mediante la tinción con fucsina, un indicador

de hidratos de carbono (Fig. 5). Sin embargo, en la corteza interna se observa una desorganización celular y un aumento del tamaño de las células que conforman la zona 3 o zona de distribución (Figs. 4D-4F). Con respecto a la zona infectada, se observa la presencia de células senescentes (indicado con una flecha) y un aumento de los espacios intercelulares (Fig. 4D).

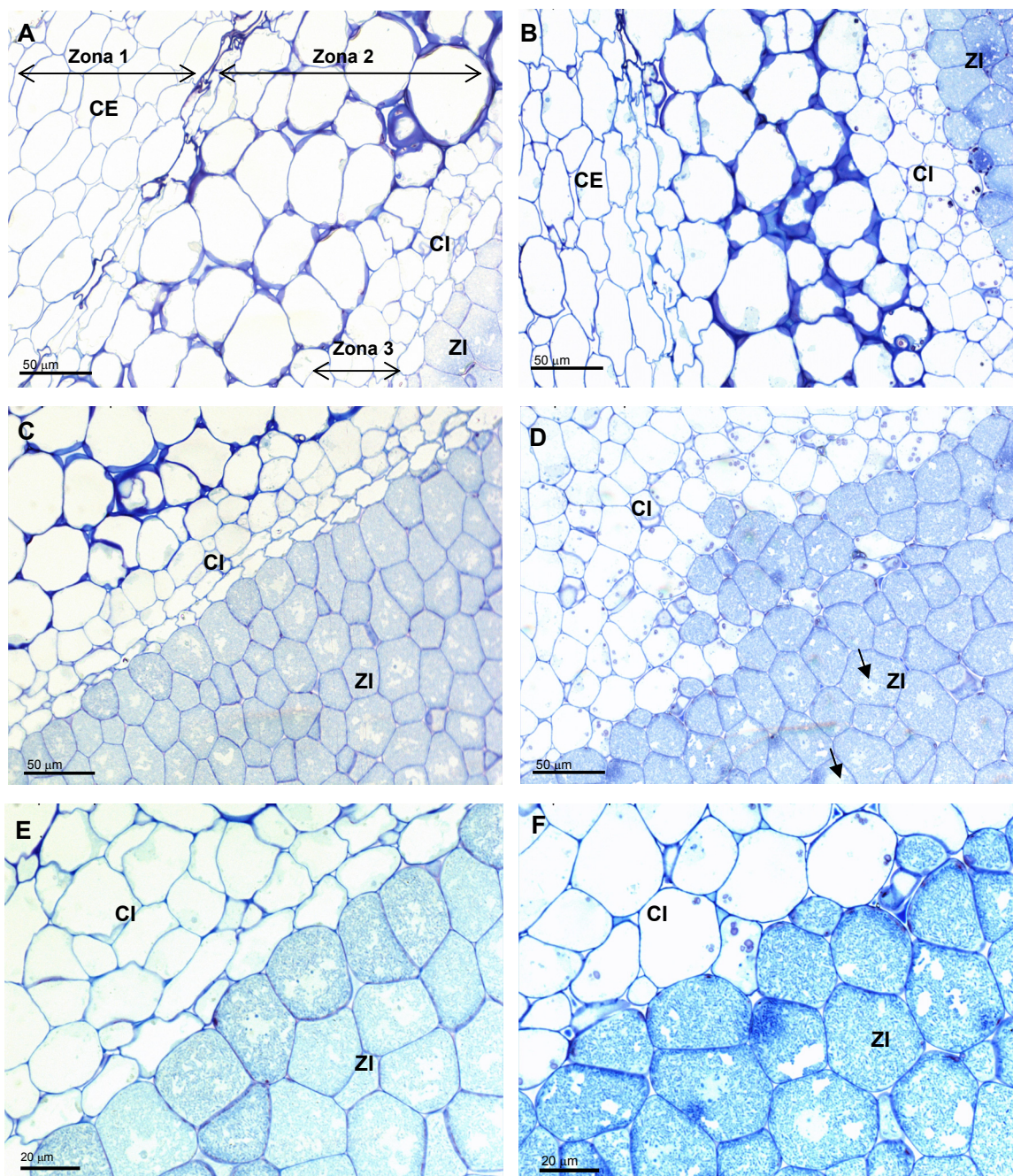


Fig. 4. Microfotografías ópticas de secciones transversales de nódulos de altramuz: 1,6 µM Cu (A, C y E) y 192 µM Cu (B, D y F). CE: córtex externo; CI: córtex interno; ZI: zona infectada

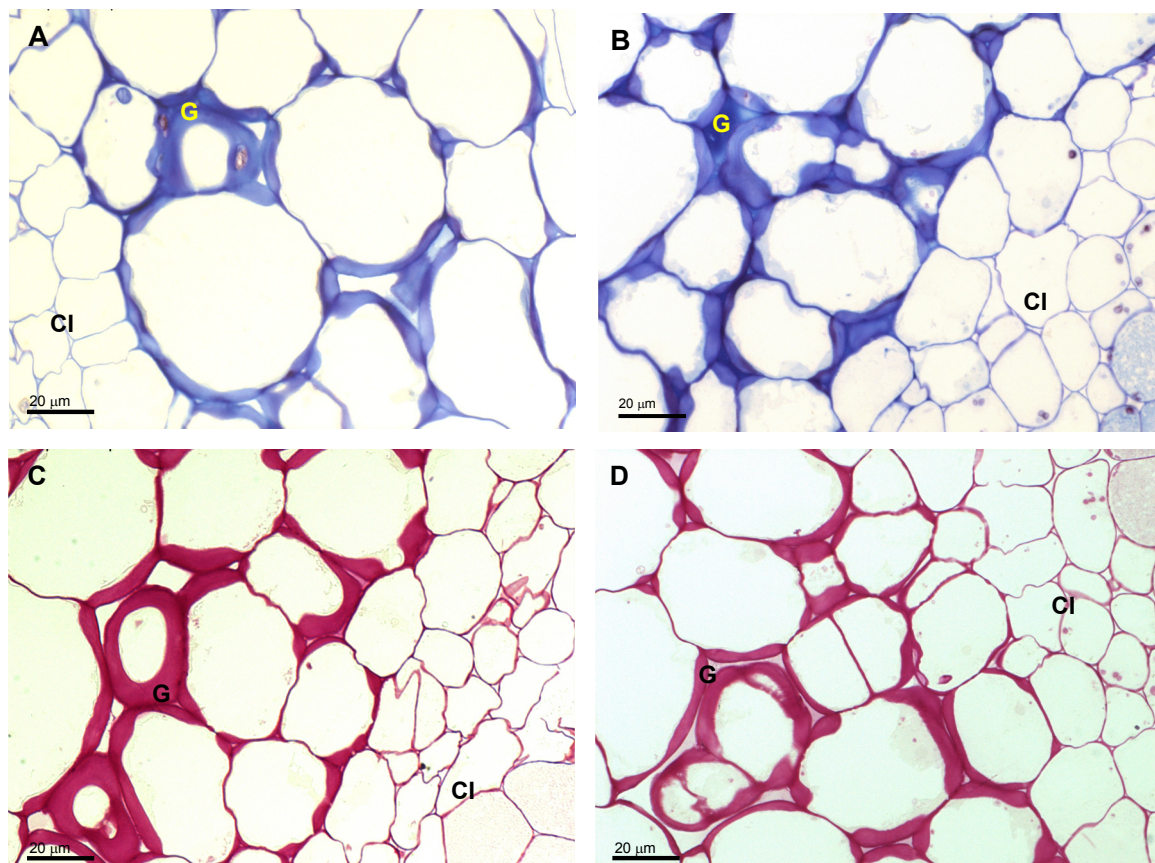


Fig. 5. Microfotografías ópticas del contenido de glicoproteína, obtenidas mediante tinción con toluidina (imágenes superiores) y fucsina (imágenes inferiores), en nódulos de altramuz: 1,6 μM Cu (A y C) y 192 μM Cu (B y D). CI: córtex interno; G: glicoproteína

La estructura de los nódulos de soja ha sido previamente descrita por [Parson y Day \(1990\)](#) y [de Lorenzo \(1992\)](#). Al igual que en los de altramuz, el córtex externo está formado por cinco o seis capas de células con espacios intercelulares entre ellas y con paredes no engrosadas. A continuación se encuentra la corteza media o esclereidas formada por dos o tres capas de células de mayor tamaño que las anteriores, las cuales tienen la pared celular uniformemente engrosada. Los espacios intercelulares entre ellas son pequeños. En la corteza interna, se aprecia en primer lugar dos capas de células de menor tamaño que las esclereidas, sin paredes engrosadas y con espacios intercelulares. Debajo se observa una nueva capa de células cuyas paredes se orientan en direcciones radiales y no presentan espacios entre ellas. A esta capa se la denominó “capa límite” o “boundary layer”. Entre la “boundary layer” y la zona

infectada, aparecen dos o tres capas celulares con pequeños espacios, que constituyen una zona de distribución de los gases, que han difundido a través de la barrera hacia la zona infectada. Por último, en la parte central del nódulo se observa la zona infectada, la cual está constituida por células infectadas y no infectadas (Figs. 6A, 6C y 6E).

Los nódulos de soja procedentes de la dosis más alta de Cu, también presentan una estructura bien organizada. Si bien, el exceso de Cu provoca en la corteza media una reducción del tamaño de las esclereidas y de los espacios intercelulares, así como un aumento del contenido de glicoproteínas (Figs. 6C-6D). Igualmente se observa una reducción del volumen de las células de la zona de distribución y un aumento del grado de compactación entre ellas. Además, hay un incremento del grado de vacuolización en las células infectadas y la aparición de precipitados en el interior de estos orgánulos; llegando en ocasiones a ocupar gran parte del jugo vacuolar (Figs. 6E-6F).

La estructura de secciones de los nódulos de altramuza y soja de las plantas expuestas a 1,6 y 192 μM de Cu obtenida mediante LTSEM, aparece reflejada en la Fig. 7. En los de altramuza, el aporte de 192 μM Cu, provoca una alteración de la forma de las células infectadas y aumenta los espacios intercelulares entre ellas (Figs. 7A-7B). En los nódulos de soja del tratamiento 192 μM Cu, únicamente se observa un aumento del tamaño de las no células infectadas (Figs. 7C-7D).

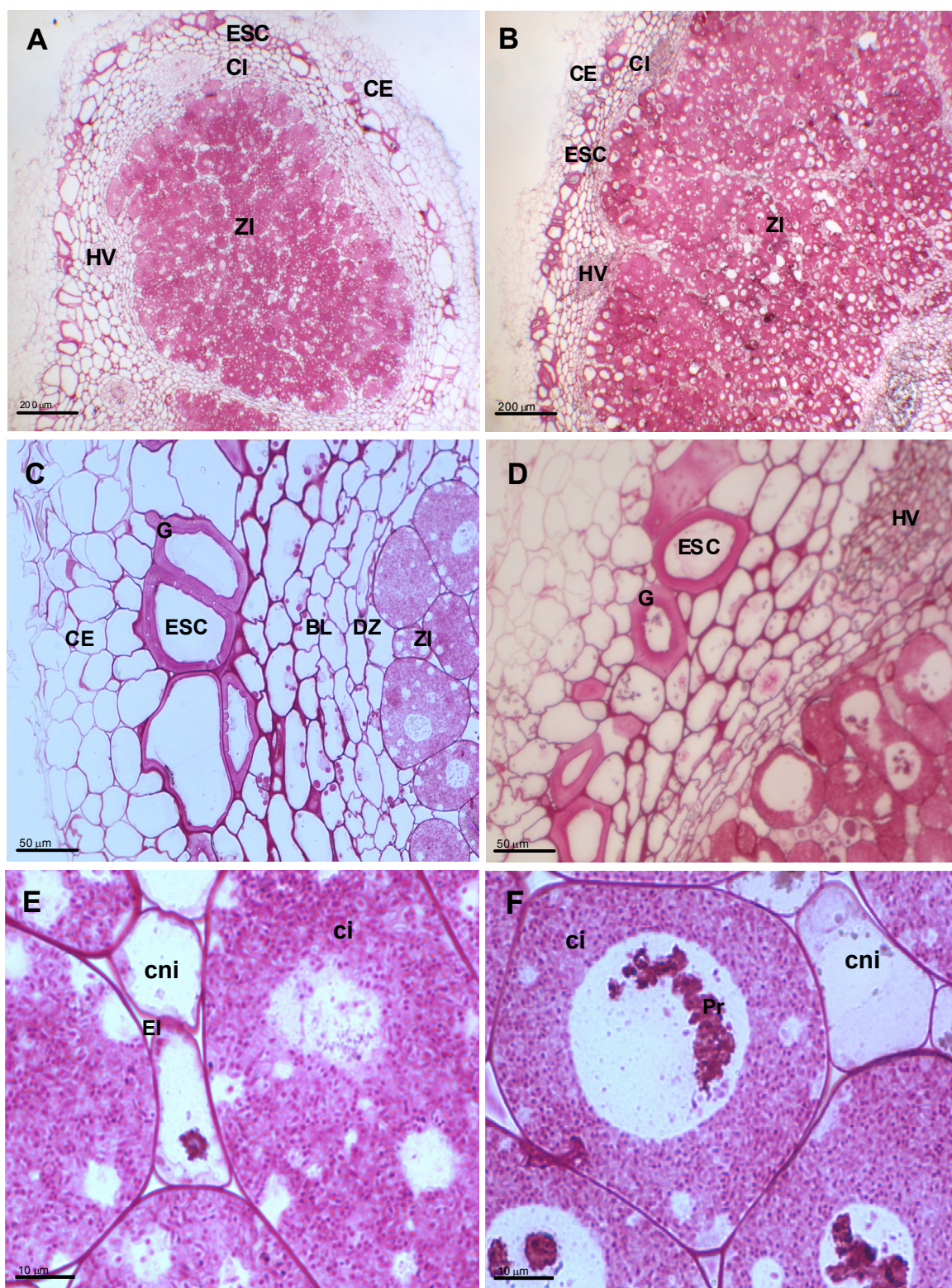


Fig. 6. Microfotografías ópticas de secciones transversales de nódulos de soja: 1,6 μM Cu (A, C y E) y 192 μM Cu (B, D y F). BL: Boundary layer; CE: córtex externo; CI: córtex interno; ci: células infectadas; cni: células no infectadas; DZ: zona de distribución; EI: espacio intercelular; ESC: esclereidas; G: glicoproteína; HV: haz vascular; ZI: zona infectada

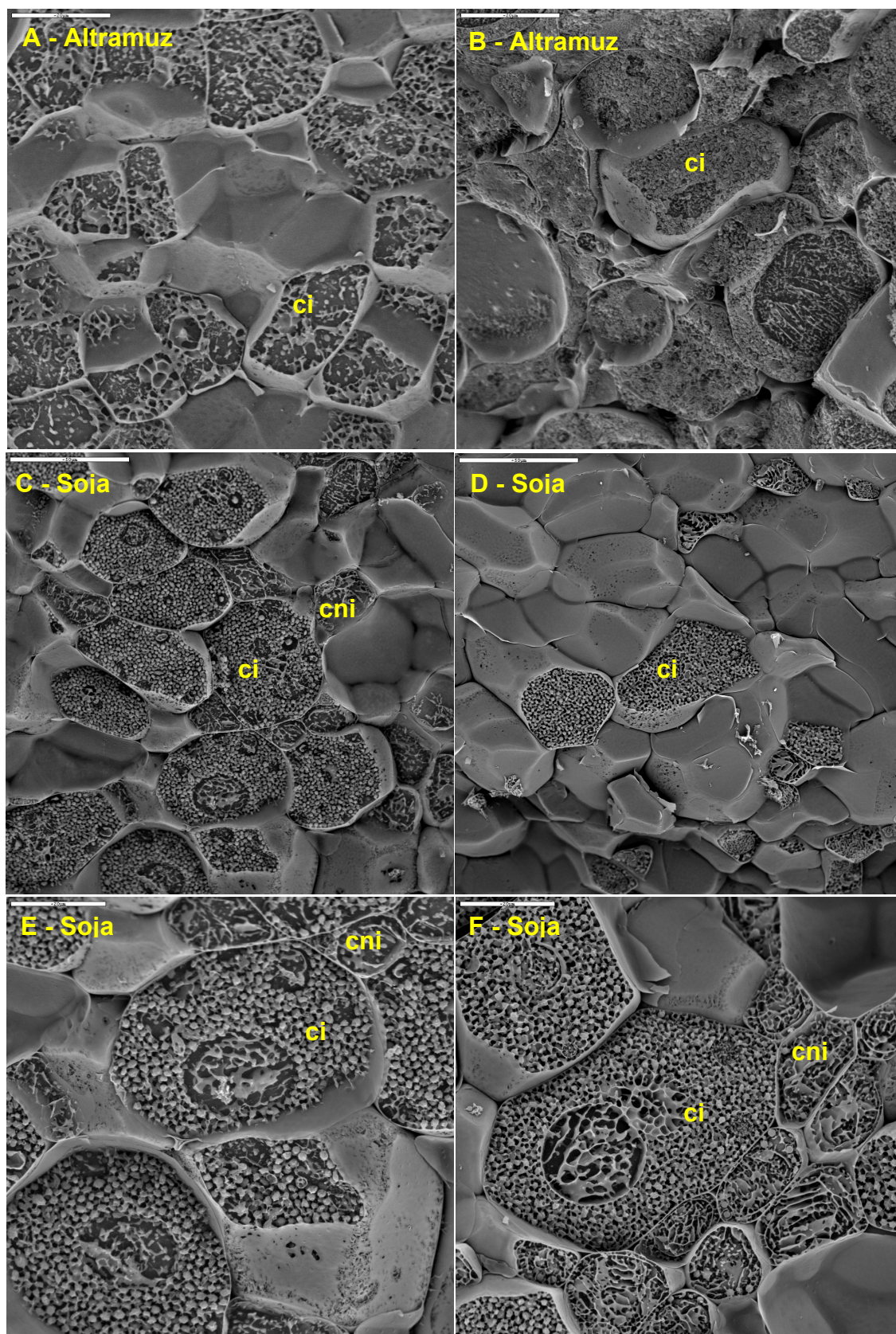


Fig. 7. Microfotografías de la zona infectada de nódulos de altramuz y soja obtenidas mediante LTSEM: 1,6 µM Cu (A, C y E) y 192 µM Cu (B, D y F). ci: célula infectada; cni: célula no infectada

El efecto de las dos dosis de Cu (1,6 y 192 μ M) sobre la ultraestructura de nódulos de plantas de altramuzy soja se ha observado también mediante el empleo de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las microfotografías obtenidas para los nódulos de las dos leguminosas se muestran en las Figs. 8 y 9. Las células infectadas de los nódulos de altramuzy procedentes del tratamiento control muestran una buena organización celular; se observa la presencia de mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplasmático y un elevado número de simbiosomas, cada uno de ellos formado por un único bacteroide (Figs. 8A-8C). Al suministrar 192 μ M Cu, la estructura del simbiosoma sufre modificaciones. En algunos casos, la membrana peribacteroidal aparece rota o desaparece, dejando a los bacteroides en contacto directo con el citoplasma celular, mientras que en otros casos, estas membranas sufren deformaciones, presentando la membrana peribacteroidal de los simbiosomas formas sinuosas. Además, se aprecia un aumento de vesículas en el citosol, mientras que el retículo endoplasmático, mitocondrias y peroxisomas permanecen inalterados (Figs. 8B-8D).

Los nódulos de soja tratados con 1,6 μ M Cu presentan también una buena organización a nivel ultraestructural (Figs. 9A-9C). Las células infectadas se encuentran repletas de simbiosomas, los cuales contienen varios bacteroides (Fig. 9C). En los nódulos expuestos a 192 μ M, se observan algunas alteraciones tanto en las células infectadas como en las que no lo están. En esta últimas, hay un mayor número de peroxisomas pero de menor tamaño (Fig. 9B). En ambos tipos de células, se observa la aparición de precipitados, así como la degradación o separación de la membrana bacteroidal en las infectadas (Figs. 9D-9F).

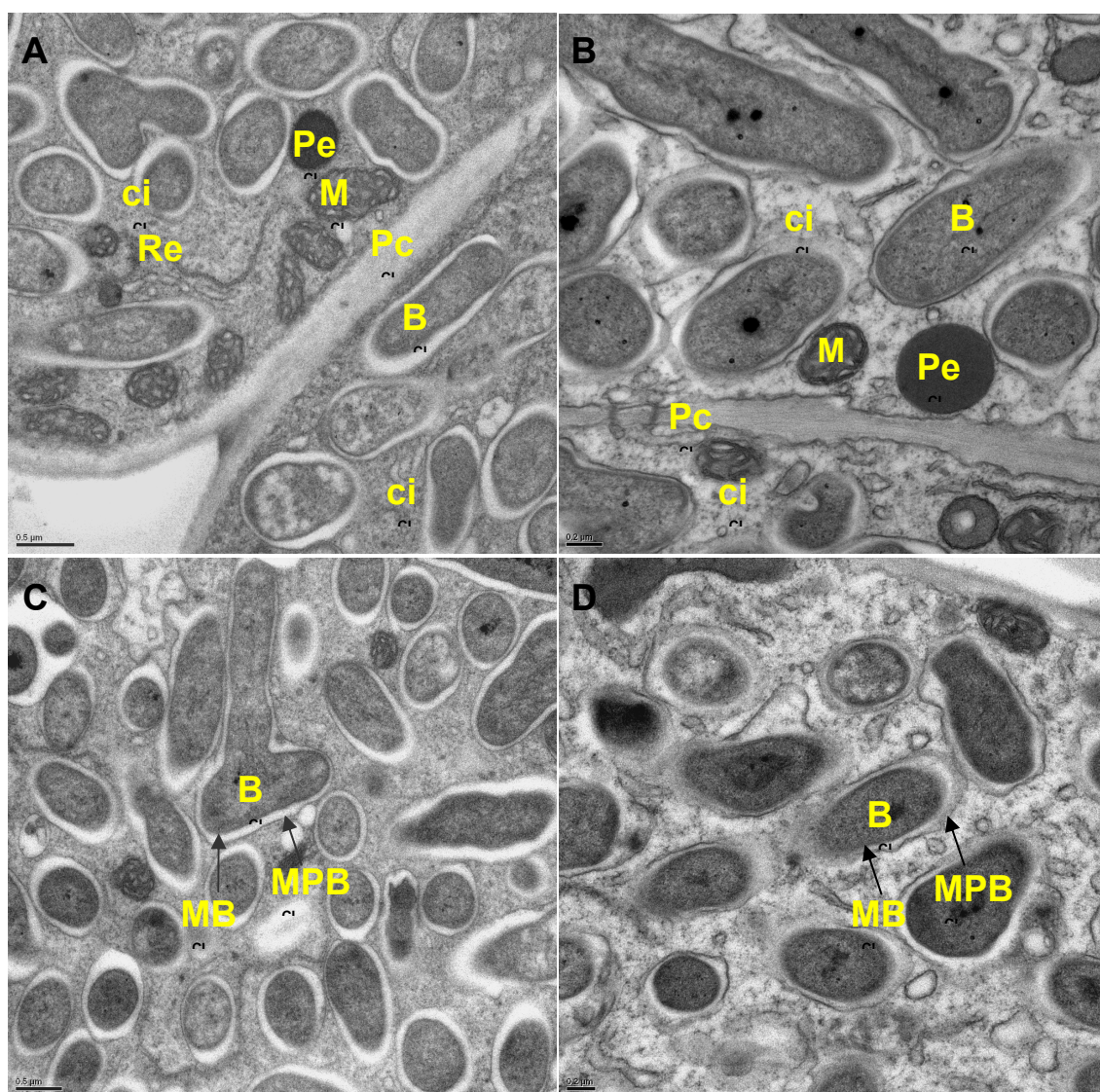


Fig. 8. Microfotografías de secciones transversales de nódulos de *altramuz* obtenidas mediante TEM: 1,6 μM Cu (A y C) y 192 μM Cu (B y D). B: bacteroide; ci: célula infectada; M: mitocondria MB: membrana bacteroidal; MPB: membrana peribacteroidal; Pe: peroxisoma; Pc: pared celular; Re: retículo endoplásmatico

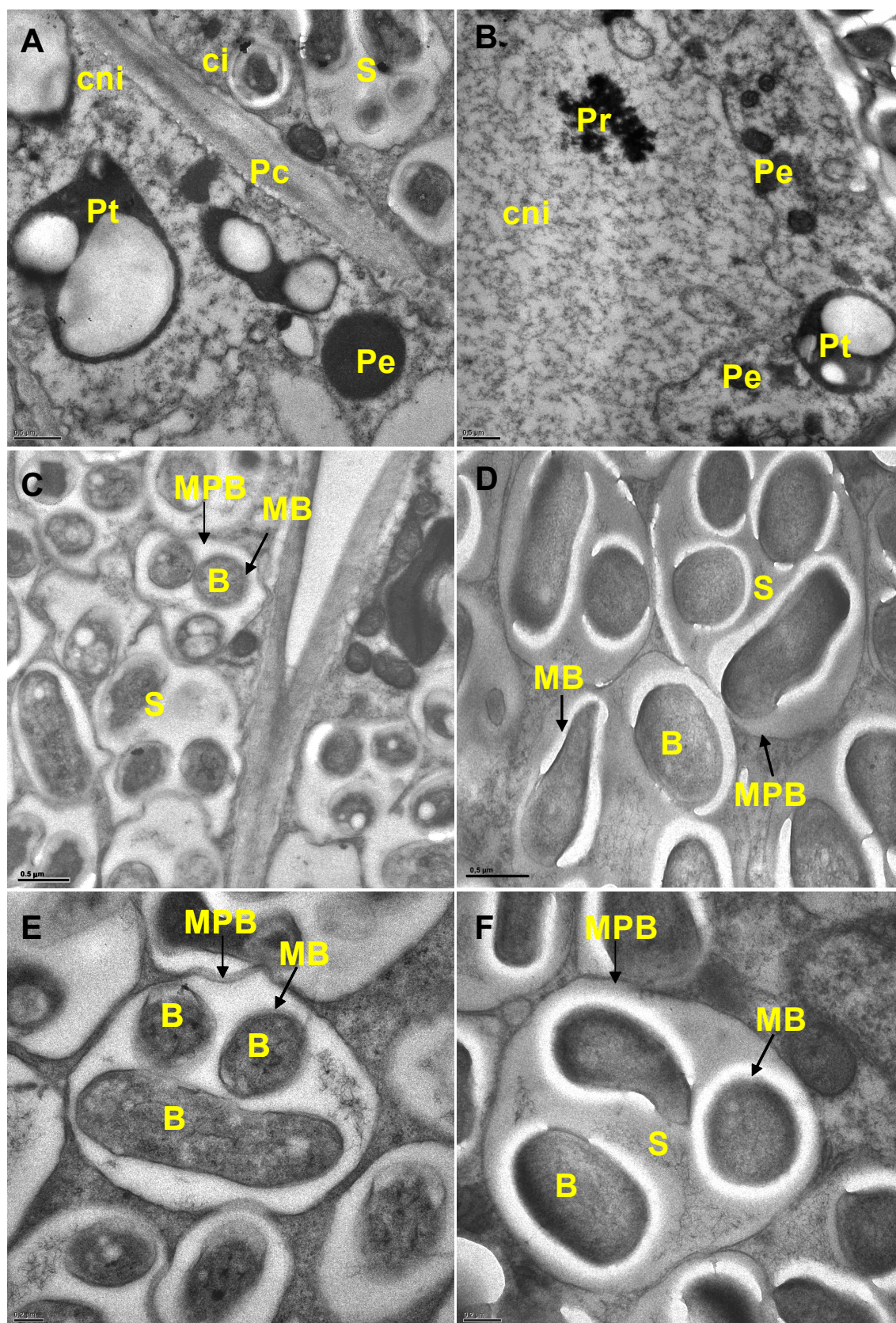


Fig. 9. Microfotografías de secciones transversales de nódulos de soja obtenidas mediante TEM: 1,6 μM Cu (A, C y E) y 192 μM Cu (B, D y F). B: bacteroide; ci: célula infectada; cni: célula no infectada; MB: membrana bacteroidal; MPB: membrana peribacteroidal; Pe: peroxisoma; Pc: pared celular; Pr: precipitados Pt: plástido; S: simbiosoma

1.5. Actividades enzimáticas del metabolismo de N y C en nódulos

El efecto de dosis crecientes de Cu sobre las actividades enzimáticas del metabolismo del N en nódulos de altramuz y soja se muestra en la [Tabla 3](#). En los nódulos de altramuz tratados con 96 y 192 μM Cu, las actividades de las enzimas AAT, GOGAT y GS disminuyen significativamente en comparación a los valores del control. Al examinar los datos de los nódulos de las plantas tratadas con 1,6 y 48 μM Cu, no se detectan diferencias significativas en las actividades enzimáticas AAT y GS, pero se observa un aumento de la GOGAT. La enzima ICDH no se ve afectada por la dosis de Cu en el medio. En los nódulos de soja, la actividad de la enzima AAT no se ve afectada significativamente por la dosis de Cu suministrada. En cambio, el aumento en el aporte de Cu, reduce la actividad de la GS. El efecto contrario se observa en el resto de actividades enzimáticas analizadas (GOGAT y ICDH).

Tabla 3. Actividades enzimáticas del metabolismo del N ($\mu\text{mol NAD(P)H g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$) en nódulos de altramuz y soja cultivados durante 35 días con dosis crecientes de Cu (1,6-192 μM). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

Enzimas	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Aspartato aminotransferasa (AAT)	6,72 \pm 0,31 ^a	6,61 \pm 0,67 ^a	4,43 \pm 0,17 ^b	2,82 \pm 0,25 ^c
Glutamato sintasa (GOGAT)	0,64 \pm 0,02 ^a	0,81 \pm 0,03 ^b	0,52 \pm 0,02 ^c	0,43 \pm 0,02 ^d
Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	2,12 \pm 0,10 ^a	2,30 \pm 0,03 ^a	2,14 \pm 0,15 ^a	2,20 \pm 0,09 ^a
Glutamina sintetasa (GS)	2,23 \pm 0,15 ^a	2,64 \pm 0,18 ^a	1,30 \pm 0,10 ^b	1,00 \pm 0,12 ^b
<i>Soja</i>				
Aspartato aminotransferasa (AAT)	13,47 \pm 0,12 ^a	13,35 \pm 0,24 ^a	13,85 \pm 0,14 ^a	13,43 \pm 0,26 ^a
Glutamato sintasa (GOGAT)	0,69 \pm 0,02 ^a	0,77 \pm 0,02 ^b	0,83 \pm 0,02 ^c	0,72 \pm 0,02 ^{ab}
Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	2,26 \pm 0,10 ^a	2,66 \pm 0,09 ^b	2,72 \pm 0,02 ^b	2,65 \pm 0,08 ^b
Glutamina sintetasa (GS)	7,66 \pm 0,40 ^a	6,65 \pm 0,18 ^b	6,04 \pm 0,22 ^{bc}	5,69 \pm 0,12 ^c

Los resultados de las actividades enzimáticas del metabolismo de C medidas en los nódulos de altramuz y soja tratados con dosis crecientes de Cu se muestran en la [Tabla 4](#). En altramuz, los nódulos procedentes del tratamiento 48 μM Cu presentan actividades SS, MDH, PEPC y UDPGPPasa más elevadas que el control (1,6 μM Cu). El

resto de dosis de Cu presentan valores similares al control. En los nódulos de soja, la dosis de Cu más alta (192 μM) reduce las actividades enzimáticas SS y UDPGPPasa; el efecto contrario se observa en la PEPC. La actividad MDH aumenta significativamente en los nódulos tratados con 96 μM , el resto de actividades medidas en estos nódulos no muestran variaciones en comparación al control. Dosis de Cu de 1,6 y 48 μM , no causan variaciones en las actividades enzimáticas medidas.

Tabla 4. Actividades enzimáticas del metabolismo del C ($\mu\text{mol NAD(P)H g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$) en nódulos de altramuza y soja cultivados durante 35 días con dosis crecientes de Cu (1,6-192 μM). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

Enzimas	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Sacarosa sintetasa (SS)	7,61 \pm 0,24 ^{ab}	9,31 \pm 0,27 ^c	8,44 \pm 0,41 ^{bc}	6,67 \pm 0,36 ^a
Malato deshidrogenasa (MDH)	135,7 \pm 6,4 ^a	161,2 \pm 7,7 ^b	125,0 \pm 3,1 ^{ac}	113,8 \pm 3,9 ^c
Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	0,97 \pm 0,05 ^a	1,65 \pm 0,12 ^b	1,14 \pm 0,11 ^a	1,11 \pm 0,13 ^a
UDPGlucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	23,69 \pm 0,93 ^{ab}	31,76 \pm 1,62 ^c	26,17 \pm 0,49 ^b	21,88 \pm 0,35 ^a
<i>Soja</i>				
Sacarosa sintetasa (SS)	9,01 \pm 0,21 ^a	9,17 \pm 0,25 ^a	8,60 \pm 0,21 ^a	7,13 \pm 0,38 ^b
Malato deshidrogenasa (MDH)	231,3 \pm 3,4 ^a	251,8 \pm 6,0 ^a	273,5 \pm 2,0 ^b	236,6 \pm 10,6 ^a
Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	1,61 \pm 0,10 ^a	1,69 \pm 0,05 ^{ab}	1,76 \pm 0,03 ^{ab}	1,84 \pm 0,02 ^b
UDPGlucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	28,88 \pm 1,33 ^a	27,57 \pm 1,39 ^a	26,58 \pm 0,21 ^a	22,78 \pm 0,73 ^b

1.6. Crecimiento y concentración de Cu en las plantas huésped

Los resultados de biomasa de plantas noduladas de altramuza y soja, sometidas a 1,6, 48, 96 y 192 μM Cu se muestran en la Fig. 10. En altramuza, el peso fresco de las hojas y tallos disminuye significativamente a medida que aumenta la dosis de Cu en el medio. Las raíces de las plantas del tratamiento 192 μM Cu tienen un peso significativamente más bajo que las del control. Al comparar el resto de tratamientos no se detecta una tendencia definida. Con respecto a la biomasa de las plantas de soja, en parte aérea se observa el mismo efecto que en altramuza; descensos a medida que aumenta la dosis de Cu. Si bien, en esta especie vegetal, las sometidas a los tratamientos de 96 y 192 μM Cu dan valores similares entre ellas. En raíz, sólo la de

las plantas tratadas con 48 μM Cu presenta un peso fresco más elevado que el control (Fig. 10).

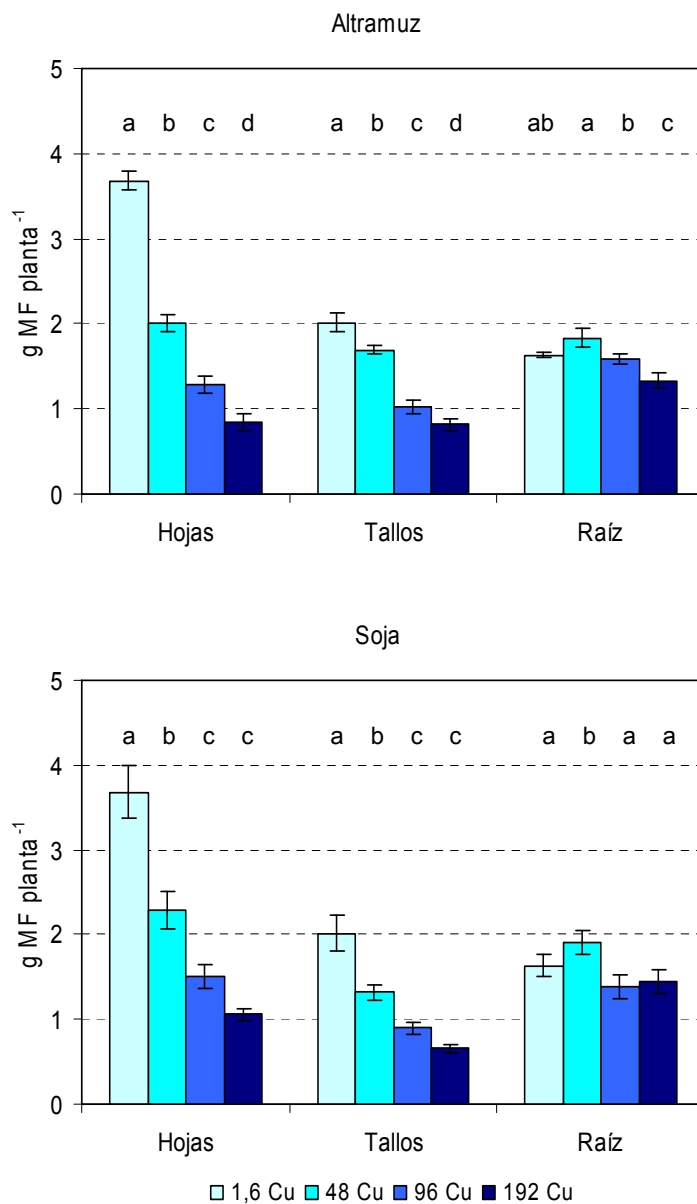


Fig. 10. Peso fresco de hojas, tallos y raíces de plantas noduladas de altramuz y soja sometidas durante 35 días a dosis crecientes de Cu (1,6-192 μM). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). Encima de las barras se encuentran los resultados del *test* de Duncan ($P < 0,05$)

La concentración de Cu en hojas, tallos y raíz de plantas noduladas de altramuz y soja tratadas con dosis crecientes de Cu, se muestra en la Fig. 11. En ambas leguminosas, la concentración de Cu aumenta en todos los órganos de la plantas a

medida que lo hace la dosis de Cu en el medio de cultivo. En las plantas de altramuza tratadas con 192 μ M la concentración de Cu en hojas, tallos y raíces se multiplica por 13, 6 y 37, respectivamente, en relación a los valores de las plantas del tratamiento control. En las plantas de soja cultivadas con 192 μ M se multiplica por 10 en hojas, por 8 en tallos y por 61 en raíz en comparación a los valores que presentan las plantas del control.

1.7. Estructura y ultraestructura de las hojas

El efecto del exceso de Cu sobre la estructura de las hojas de altramuza (Fig. 12) y soja (Fig. 13) cultivadas con 1,6 y 192 μ M de Cu y bajo condiciones de fijación de N₂ se ha llevado a cabo mediante el empleo de microscopía óptica. Las hojas de las plantas de altramuza procedentes de los tratamientos 1,6 y 192 μ M Cu muestran una estructura bien organizada (Figs. 12A-12B), la cual ha sido descrita ampliamente en el capítulo V. Aunque se observa que el aporte de 192 μ M Cu, reduce el espesor, el tamaño de las células del mesófilo y de los espacios intercelulares, siendo este último hecho más ostensible en el parénquima lagunar (Figs. 12A-12B). Asimismo, se observa que las células de ambos parénquimas tienen las paredes celulares deformadas adquiriendo una forma sinusoidal, un descenso tanto en el número como en el tamaño de los cloroplastos y la presencia de grandes gránulos de almidón (Fig. 12D). Además, los cloroplastos de las células tratadas con 192 μ M Cu aparecen separados de la pared celular, probablemente como consecuencia de la separación de la membrana plasmática de la pared celular (Figs. 12C-12F).

En soja, el exceso de Cu (192 μ M) provoca una ligera disminución del espesor de las hojas y del tamaño de las células del parénquima en empalizada, así como de las células de la epidermis adaxial y abaxial, sin embargo, no afecta al tamaño de las células del parénquima lagunar, ni al grado de empaquetamiento de las células del mesófilo (Figs. 13A-13B). En esta leguminosa, tanto los cloroplastos de las hojas control como los de las tratadas con 192 μ M Cu, contienen abundantes gránulos de almidón (Figs. 13C-13D).

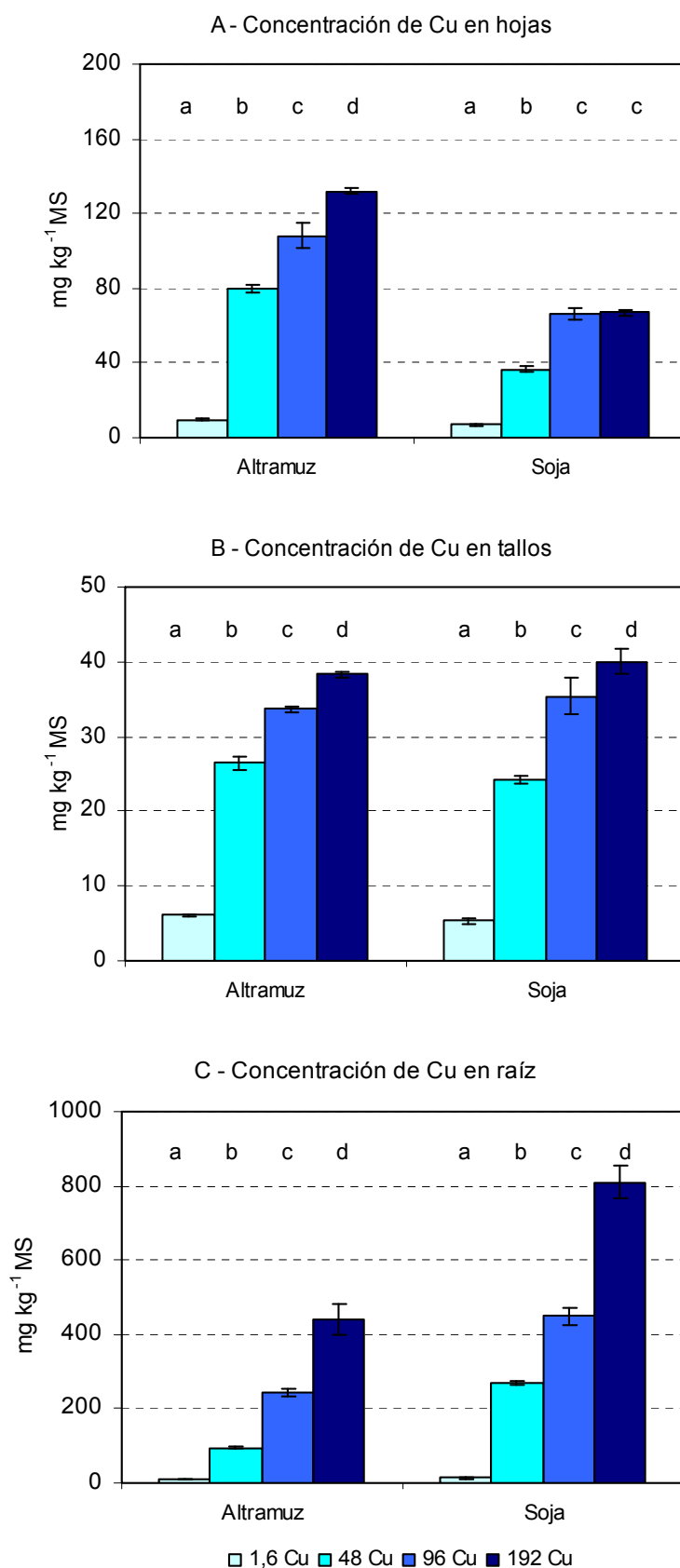


Fig. 11. Concentración de Cu en hojas, tallos y raíces de plantas noduladas de altramuz y soja sometidas a dosis crecientes de Cu (1,6-192 μ M). Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). Encima de las barras se encuentran los resultados del *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Por otro lado, el efecto del exceso de Cu sobre la ultraestructura de las hojas de plantas noduladas de altramuza y soja se ha estudiado mediante el empleo de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los resultados obtenidos para las hojas de las plantas control y las tratadas con 192 μ M Cu se muestran en las Figs. 14 y 15, respectivamente. En las células de mesófilo de las hojas de altramuza procedentes del tratamiento control (1,6 μ M Cu), se observan los cloroplastos situados junto a la pared celular, con una estructura tilacoidal bien organizada y manteniendo un alineamiento paralelo con el eje principal del cloroplasto, en algunas ocasiones hay un único gránulo de almidón o ninguno. También se observan grandes mitocondrias y abundancia de ribosomas (Figs. 14A-14B).

En las células de las hojas de altramuza tratadas con 192 μ M Cu se pueden distinguir cuatro tipos de cloroplastos: los que no tienen gránulos de almidón y presentan una estructura tilacoidal bien organizada, sin signos aparentes de degradación. Los que tienen un único gránulo de almidón, en los cuales, la estructura tilacoidal no se ve afectada, pero el estroma es más denso a los electrones. Estos cloroplastos se encuentran separados de la pared celular (Figs. 14C-14D). Lo cual confirma lo observado mediante microscopía óptica. Los que presentan más de dos gránulos de almidón y en los cuales comienzan a observarse alteraciones en la ultraestructura de los grana e intergrana, con pérdida del alineamiento paralelo con el eje principal y deterioro de los granas, lo que implica que los tilacoides no puedan ser distinguidos claramente. A su vez, el estroma muestra una elevada densidad a los electrones y se observa una separación de la membrana cloroplástica (indicado con una flecha) y en este caso, la distancia entre la pared celular y los cloroplastos es aun mayor que en los anteriores (Fig. 14E). Y por último, los cloroplastos totalmente llenos de almidón, con una estructura tilacoidal totalmente desorganizada y con evidentes síntomas de degradación. También se aprecia un gran deterioro de otros orgánulos como las mitocondrias y la falta de nitidez del tonoplasto (Fig. 14F).

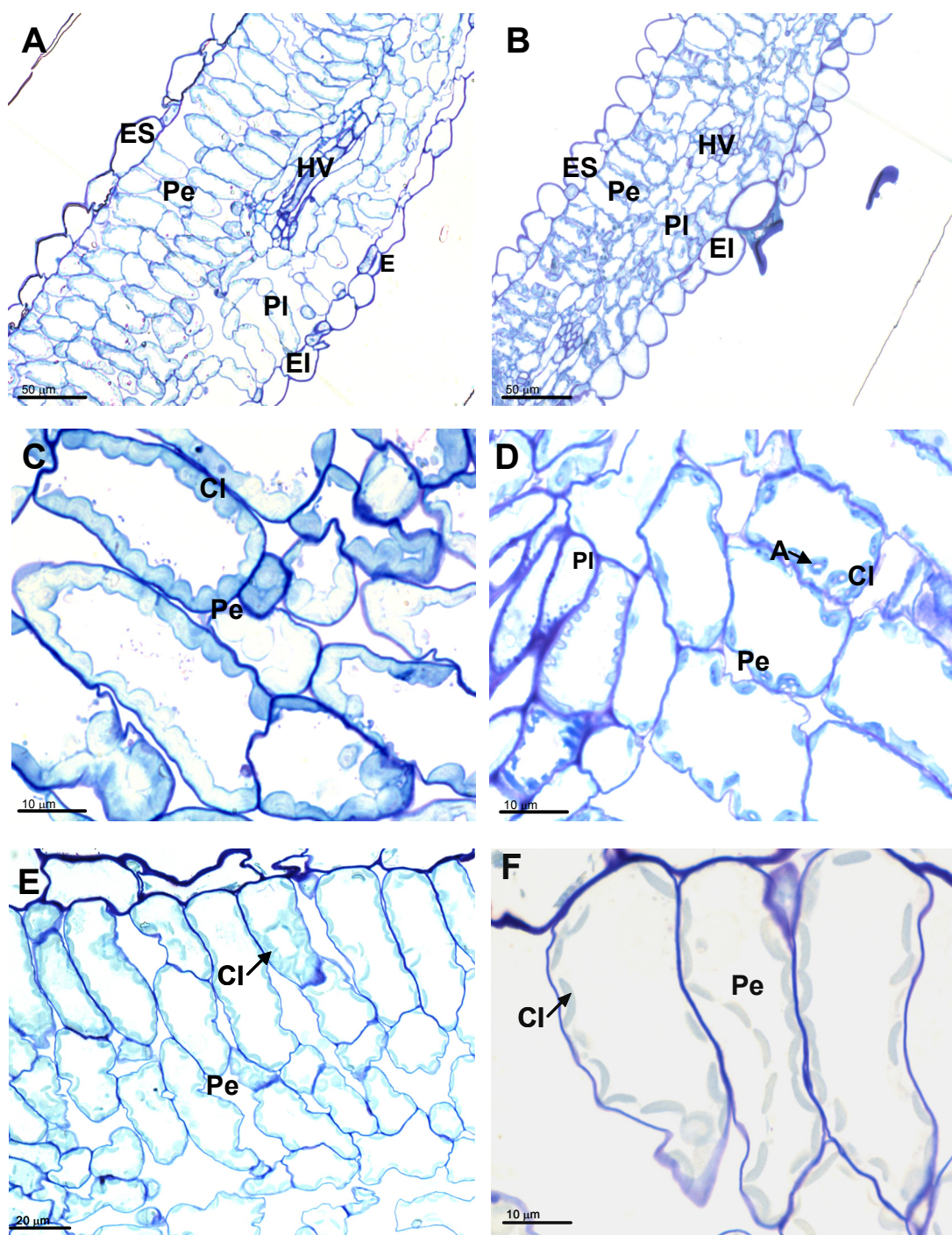


Fig. 12. Microfotografías ópticas de secciones transversales de hojas de altramuz: 1,6 μM Cu (A y C) y 192 μM Cu (B, D, E y F). A: almidón; Cl: cloroplastos; E: estoma; EI: epidermis inferior; ES: epidermis superior; HV: haz vascular; Pe: parénquima empalizada; PI: parénquima lagunar

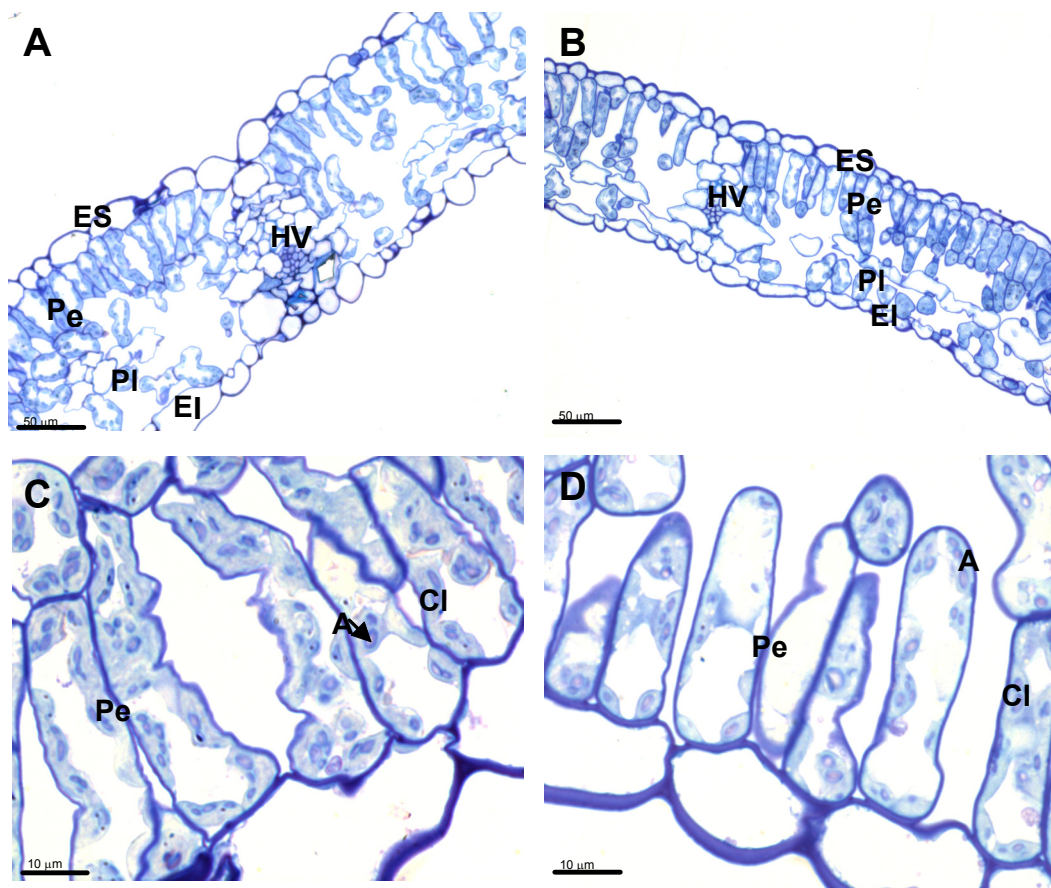


Fig. 13. Microfotografías ópticas de secciones transversales de hojas de soja: 1,6 μM Cu (A y C); 192 μM Cu (B y D). A: almidón; Cl: cloroplastos; EI: epidermis inferior; ES: epidermis superior; HV: haz vascular; Pe: parénquima empalizada; PI: parénquima lagunar

Por otro lado, en las células de las hojas de soja del tratamiento control se observa una buena organización celular, donde las mitocondrias, vacuola, ribosomas, retículo endoplásmico y los cloroplastos aparecen en perfecto estado (Figs. 15A-15B). Estos últimos, muestran una estructura tilacoidal bien organizada, con un alineamiento paralelo al eje principal y entre 2-4 gránulos de almidón (Figs. 15A-15B). En las hojas de las plantas cultivadas con 192 μM Cu, aumenta el número de gránulos de almidón, oscilando entre 2 y 7, pero la media es de cinco para la mayoría de los cloroplastos (Figs. 15C-15D). Asimismo, se aprecia un desprendimiento de la membrana cloroplástica y la pérdida de la orientación paralela al eje del cloroplasto. Los grana tienen un menor número de tilacoides, algunos hinchados, lo cual puede ser la causa de la presencia de plastoglóbulos. (Figs. 15C-15F). Del mismo modo, las

membranas del cloroplasto presentan signos indicativos de la pérdida de lípidos y la presencia de glóbulos lipídicos característicos de tejidos degradados (Fig. 15F).

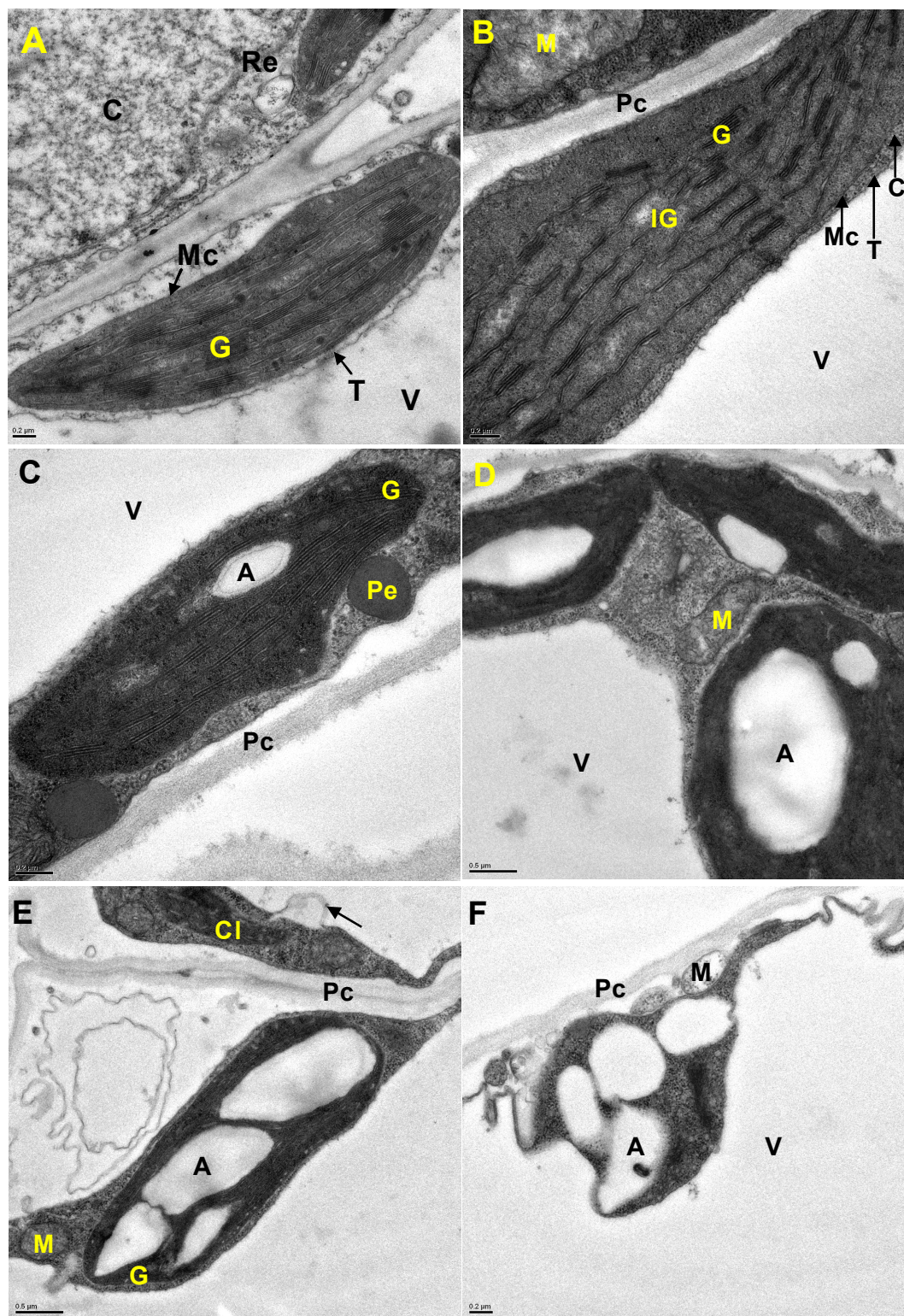


Fig. 14. Microfotografías de secciones transversales de hojas de altramuz obtenidas mediante TEM: 1,6 μM Cu (A y B); 192 μM Cu (C, D, E y F). A: almidón; C: citosol; G: grana; IG: intergrana; M: mitocondria; Mc: membrana cloroplástica; P: plasmalema; Pc: pared celular; Pe: peroxisomas; Re: retículo endoplasmático; T: tonoplasto; V: vacuola

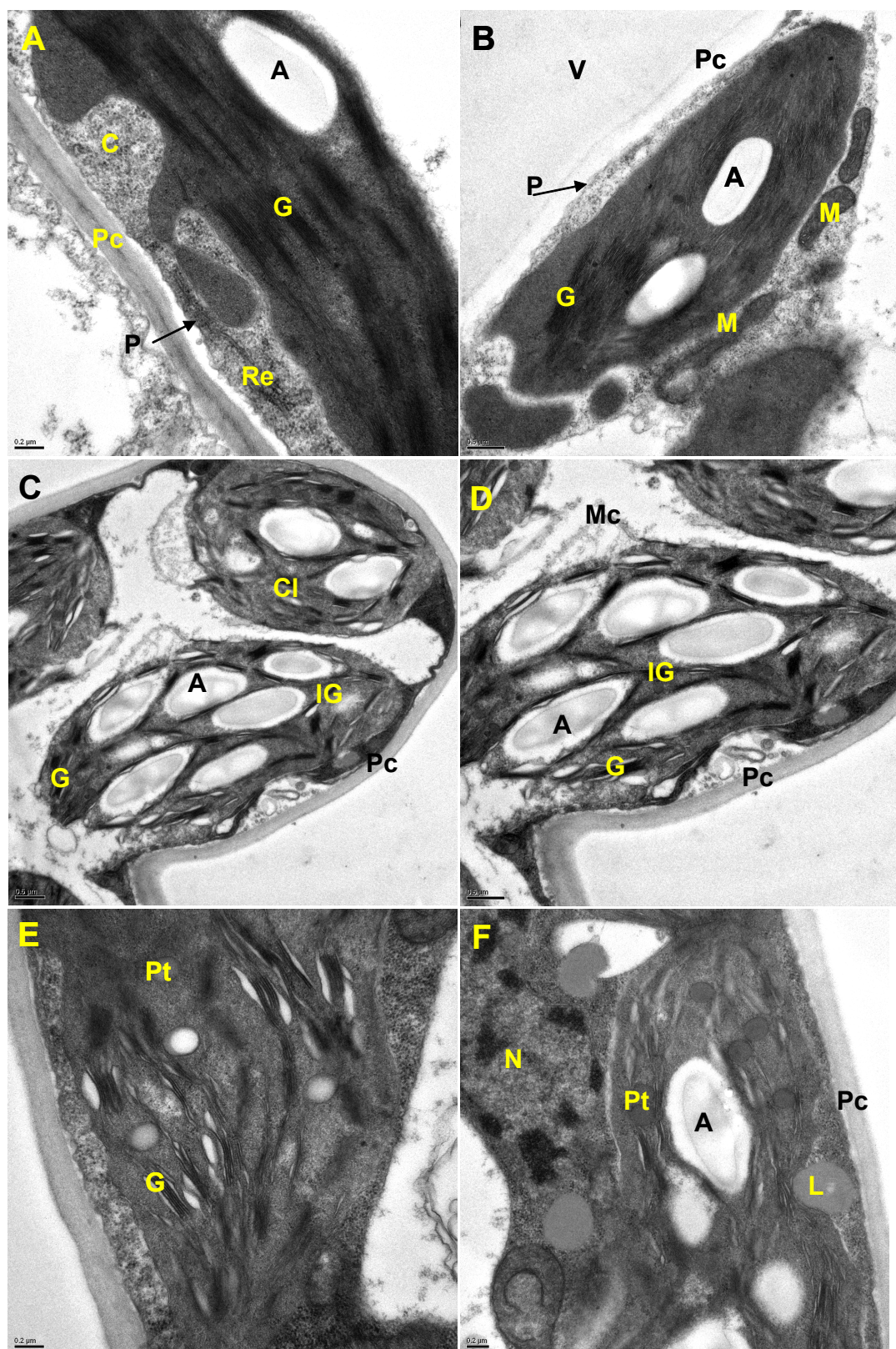


Fig. 15. Microfotografías de secciones transversales de hojas de soja obtenidas mediante TEM: 1,6 μ M Cu (A y B); 192 μ M Cu (C, D, E y F). A: almidón; C: citosol; G: grana; IG: intergrana; L: lípido; M: mitocondria; Mc: membrana cloroplástica; P: plasmalema; Pc: pared celular; Pt: plastoglobulo; Re: retículo endoplasmático T: tonoplasto; V: vacuola

1.8. Concentración y distribución de Fe, Mn, Zn y Ni en planta y nódulo

Las concentraciones medias de Fe, Mn, Zn y Ni en hojas, tallos, raíces y nódulos de plantas de altramuz y soja sometidas a 1,6, 48, 96 y 192 μM Cu, se recogen en las [Tablas 4 y 5](#), respectivamente. En altramuz, el aporte de 48 μM de Cu reduce de forma significativa la concentración de Fe, Mn, Zn en todos los órganos de la planta huésped, siendo estos descensos mayores en la parte aérea que en la subterránea de la planta. Por el contrario, aumenta la de Ni en hoja y no modifica la de raíz. En tallos y raíces de las plantas de altramuz tratadas con las dosis más altas de Cu no se detecta Ni. Al suministrar 96 μM Cu, las disminuciones de Fe y Mn en los órganos analizados se hacen más acusadas, en cambio no varía la concentración de Zn. A partir de esta dosis se mantiene el contenido de Fe y Zn en todos los órganos de la planta, mientras que sigue decreciendo el de Mn en hojas y tallos, así como el de Ni en el primer órgano mencionado. En cuanto a los nódulos, las dosis de Cu aplicadas no afectan significativamente a la concentración de Ni. Si bien, niveles de Cu $\geq 48 \mu\text{M}$ Cu reducen significativamente la concentración de Fe (13%) y Zn (39%), en cambio dosis $\geq 96 \mu\text{M}$ Cu aumentan la de Mn ([Tabla 4](#)).

En soja, la concentración de Fe se va reduciendo significativamente a medida que aumenta la dosis de Cu en el medio externo; de esta forma en los órganos de las plantas de soja tratadas con 192 μM Cu alcanza valores que son el 50% de los valores de las plantas control. El Mn tiende a disminuir en las hojas, mientras que en tallos muestra un comportamiento opuesto. En raíz, la concentración de Mn no muestra ninguna tendencia definida con la dosis del MP. La concentración de Zn en las hojas de soja también disminuye con la dosis de Cu; mientras que en tallos y raíces experimenta pocas modificaciones. La concentración de Ni se reduce en las hojas a medida que aumenta la dosis de Cu. No se detecta Ni en los tallos de las plantas tratadas con las dosis $\geq 48 \mu\text{M}$ Cu, ni tampoco en las raíces de las plantas cultivadas con dosis de Cu $\geq 96 \mu\text{M}$. Con respecto a los nódulos, la concentración de Fe disminuye significativamente al pasar del tratamiento control a 48 μM de Cu (17%), mientras que aumenta la de Zn (26%) y Ni (53%). Niveles de 96 μM Cu son necesarios

para aumentar de forma significativa la concentración de Mn en nódulos (39%). Lo cual se intensifica a medida que lo hace dosis de Cu, llegando a aumentar la concentración de Mn (72%), Zn (41%) y Ni (94%) y a disminuir un 32% la de Fe con la dosis más alta de Cu (192 μ M).

Tabla 5. Concentración de Fe, Mn, Zn y Ni (mg kg^{-1} MS) en hojas, tallos, raíz y nódulos de plantas de altramuz cultivadas con dosis crecientes de Cu (1,6-192 μ M). Los datos son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas de la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Nutriente	Órgano	Dosis Cu (μM)			
		1,6	48	96	192
Fe	Hojas	239,98 ± 4,48 ^a	41,53 ± 1,07 ^b	29,10 ± 1,57 ^c	21,85 ± 0,53 ^c
	Tallos	24,86 ± 0,86 ^a	13,58 ± 0,57 ^b	7,13 ± 0,37 ^c	6,90 ± 0,46 ^c
	Raíz	128,93 ± 3,66 ^a	97,68 ± 2,89 ^c	106,75 ± 2,52 ^{bc}	110,88 ± 3,33 ^b
	Nódulos	40,84 ± 0,75 ^a	35,71 ± 0,83 ^b	33,89 ± 1,43 ^b	33,25 ± 0,66 ^b
Mn	Hojas	991,88 ± 28,48 ^a	561,56 ± 4,22 ^b	438,19 ± 2,44 ^c	366,94 ± 2,97 ^d
	Tallos	291,00 ± 7,33 ^a	257,91 ± 2,89 ^b	203,10 ± 6,35 ^c	162,84 ± 7,44 ^d
	Raíz	108,02 ± 8,59 ^a	78,36 ± 1,37 ^b	55,74 ± 2,81 ^c	49,48 ± 4,16 ^c
	Nódulos	5,08 ± 0,21 ^a	6,23 ± 0,50 ^{ab}	7,20 ± 0,57 ^{bc}	7,87 ± 0,45 ^c
Zn	Hojas	28,50 ± 0,85 ^a	21,54 ± 0,72 ^{bc}	19,61 ± 0,68 ^c	22,93 ± 0,71 ^b
	Tallos	26,53 ± 0,94 ^a	15,38 ± 0,48 ^c	17,31 ± 0,20 ^{bc}	19,56 ± 1,14 ^b
	Raíz	73,09 ± 4,60 ^a	55,58 ± 2,52 ^b	56,06 ± 1,16 ^b	48,48 ± 2,75 ^b
	Nódulos	18,80 ± 0,71 ^a	11,53 ± 0,31 ^b	12,14 ± 0,83 ^b	19,01 ± 0,88 ^a
Ni	Hojas	2,18 ± 0,13 ^b	3,85 ± 0,31 ^a	2,51 ± 0,12 ^b	1,43 ± 0,23 ^c
	Tallos	1,78 ± 0,14	nd	nd	nd
	Raíz	3,53 ± 0,21 ^a	3,05 ± 0,57 ^a	nd	nd
	Nódulos	1,44 ± 0,12 ^a	2,03 ± 0,21 ^a	2,16 ± 0,42 ^a	1,48 ± 0,22 ^a

nd: no detectado

Tabla 6. Concentración de Fe, Mn, Zn y Ni (mg kg⁻¹ MS) en hojas, tallos, raíz y nódulos de plantas de soja cultivadas con dosis crecientes de Cu (1,6-192 µM). Los datos son las medias ± el E.T. (n = 4). Medias dentro de una fila seguidas de la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan (P < 0,05)

Nutriente	Órgano	Dosis Cu (μM)			
		1,6	48	96	192
Fe	Hojas	44,40 ± 0,93 ^a	20,87 ± 2,02 ^b	17,63 ± 1,78 ^b	16,60 ± 0,80 ^b
	Tallos	20,23 ± 0,02 ^a	9,98 ± 0,64 ^b	8,16 ± 0,85 ^c	9,69 ± 0,35 ^{bc}
	Raíz	187,13 ± 6,46 ^a	114,66 ± 4,10 ^b	92,43 ± 2,40 ^c	72,41 ± 0,59 ^d
	Nódulos	59,18 ± 2,22 ^a	49,15 ± 1,16 ^b	42,65 ± 1,22 ^c	40,04 ± 2,02 ^c
Mn	Hojas	155,82 ± 8,40 ^a	101,98 ± 2,99 ^b	111,43 ± 4,02 ^b	119,80 ± 6,65 ^b
	Tallos	67,45 ± 1,51 ^a	82,33 ± 3,67 ^{bc}	86,66 ± 2,89 ^c	76,37 ± 3,18 ^{ab}
	Raíz	59,73 ± 1,43 ^{ab}	114,10 ± 2,50 ^c	71,76 ± 4,67 ^b	50,93 ± 6,57 ^a
	Nódulos	7,63 ± 0,31 ^a	7,07 ± 0,54 ^a	10,61 ± 0,65 ^b	13,10 ± 0,80 ^c
Zn	Hojas	24,24 ± 1,27 ^a	13,50 ± 0,78 ^b	13,35 ± 0,16 ^b	12,15 ± 0,95 ^b
	Tallos	20,91 ± 0,80 ^a	15,51 ± 0,53 ^b	14,40 ± 0,97 ^b	18,98 ± 1,18 ^a
	Raíz	22,25 ± 1,81 ^a	21,00 ± 0,96 ^a	24,45 ± 0,54 ^a	22,99 ± 2,40 ^a
	Nódulos	7,84 ± 0,29 ^a	9,86 ± 0,82 ^b	10,57 ± 0,67 ^b	11,04 ± 0,55 ^b
Ni	Hojas	2,78 ± 0,15 ^a	1,08 ± 0,12 ^c	1,14 ± 0,19 ^c	1,65 ± 0,11 ^b
	Tallos	0,84 ± 0,9	nd	nd	nd
	Raíz	1,05 ± 0,15 ^a	0,54 ± 0,6 ^b	nd	nd
	Nódulos	1,59 ± 0,19 ^a	2,43 ± 0,16 ^b	2,37 ± 0,17 ^b	3,08 ± 0,07 ^c

nd: no detectado

2.- Discusión del efecto del Cu sobre el desarrollo y funcionamiento de plantas noduladas de altramuiz y soja

El efecto negativo de niveles elevados de Cu sobre el crecimiento y el metabolismo de las plantas (Kabata-Pendias y Pendias, 2000; Mengel y Kirkby, 2001), así como sobre la actividad biológica del suelo ha sido descrito por diversos autores (El-Ghamry y col., 2000). Sin embargo, existen pocos estudios centrados en el efecto del estrés de Cu sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y sobre la ultraestructura y localización subcelular del MP en nódulos de leguminosas. Por tanto, con la finalidad

de determinar la influencia de concentraciones elevadas de Cu sobre estos aspectos, se han planteado varios experimentos dosis-repuesta en hidroponía con sustrato y bajo condiciones de fijación de N₂, con plantas de altramuz y soja tratadas con dosis crecientes de Cu (1,6, 48, 96 y 192 μ M).

Por otro lado, para conocer la dosis de Cu que está realmente a disposición de las plantas noduladas, se ha evaluado la cantidad de Cu disponible y adsorbido por el sustrato de cultivo (perlita). Los resultados obtenidos muestran una baja capacidad de la perlita para retener Cu, si bien, la disponibilidad en porcentaje disminuye a medida que aumenta la dosis aportada (Fig. 1). Las concentraciones de Cu realmente disponibles para la plantas son, respectivamente, del orden de 39, 73 y 136 μ M para las dosis 48, 96 y 192 μ M Cu. La perlita tiene una gran capacidad para adsorber Cd, como lo ponen de manifiesto los resultados obtenidos por Mathialagan y Viraraghavan (2002) y Vázquez y Carpena-Ruíz (2005). Estos últimos autores estiman que aproximadamente un 50% del Cd suministrado a las plantas, queda retenido en la perlita.

En este estudio se observa cómo a medida que aumenta la concentración de Cu en el medio de cultivo, disminuye el peso y el número de nódulos en ambas especies estudiadas. Sin embargo, sólo la dosis de Cu más alta (192 μ M) afecta al peso medio de los nódulos, reduciéndolo en soja y aumentándolo en altramuz (Tabla 1). Kopittke y col. (2007) también observan un descenso en el número de nódulos en raíces de caupí al aumentar el nivel de Cu aportado. Resultados similares a los obtenidos en este trabajo se han detectado en diversas plantas, tal es el caso de altramuz cultivado con Cd (Zornoza y col., 2002; Carpena y col., 2003) y exceso de Zn (Pastor y col., 2003); en plantas de soja tratadas con Cd (Chen y col., 2003) y As (Reichman, 2007) y en plantas de judía (Vigue y col., 1981) y guisante (Hernández y col., 1995) tratadas con Cd. En la mayoría de los casos, las plantas tienen menos nódulos, pero de un tamaño mayor.

El efecto perjudicial del estrés por Cu también ha afectado negativamente al peso del vástago de las plantas huésped, aunque ha tenido poca significación en el desarrollo de las raíces (Figs. 10). Si bien, los descensos detectados tanto en la parte aérea como en el nódulo, son más acusados en altramuza que en soja. Estos resultados ponen de manifiesto que en altramuza, tanto el desarrollo de la parte aérea como la nodulación se muestran muy sensibles al exceso de Cu ($\geq 48 \mu\text{M}$). Sin embargo en soja, el desarrollo de la parte aérea se ve afectado a dosis más bajas de Cu que el proceso de nodulación. Según Kopittke y col. (2007), la vulnerabilidad al Cu que presenta el proceso de nodulación, podría ser debido a un menor desarrollo de la cabellera radicular y, por tanto, de los sitios potenciales de infección, más que a un efecto directo del Cu sobre el rizobio. Algo similar, se ha detectado en plantas de altramuza tratadas con Cd (Zornoza y col., 2002) y en plantas de soja cultivadas con As (Reichman 2007) y Al (Brady y col., 1990).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la fijación de N₂ es un proceso muy sensible a numerosas situaciones de estrés: hídrico (González y col., 1998), oxidativo (Balestrasse y col., 2001), salino (Fernández-Pascual y col., 1996), presencia de nitratos (de Lorenzo y col., 1990), herbicidas (de María y col., 2005) y elementos traza (Carpena y col., 2006). El efecto adverso que ejercen los estreses abióticos sobre la FBN, incluye el proceso de infección, crecimiento y desarrollo del nódulo y, por tanto, afecta al proceso de FBN (Carpena y col., 2003; Fernández-Pascual y col., 2007). La tolerancia de los rizobios a los MP, como el Cd, varía con la especie vegetal y la cepa de *Rhizobium* (Ruiz Diez y col., 2009).

En este estudio, la fijación de N₂ estimada como exportación total de N e índice SNF, se reducen en ambas leguminosas a medida que aumenta la dosis externa de Cu. Este hecho, es más acusado en altramuza que en soja y en ambos casos ha afectado casi exclusivamente a la parte aérea (Tabla 2). Georgiev y col. (1996) encuentran un menor contenido de N total en la planta y nódulos de acacia blanca sometidos a estrés por Cu. Otros autores detectan un descenso de N₂ fijado en plantas de altramuza y de aminoácidos en nódulos expuestos al Cd (Carpena y col.,

2003). En soja, el Cd también afecta de forma negativa al proceso de fijación y asimilación de N (Balestrasse y col., 2003).

Por otro lado, diversas enzimas del metabolismo del N y C en los nódulos se ven afectadas por la presencia de niveles elevados de MPs, como es el caso del Cu (Llorens y col., 2000; Demirevska-Kepova y col., 2004) y el Cd (Gouia y col., 2003). También se observa este hecho, en condiciones de déficit hídrico (González y col., 1998; Gálvez y col., 2005), aplicación de herbicidas (de María y col., 2006) y oscuridad (Gogorcena y col., 1997). En este trabajo, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la susceptibilidad que presentan diversas enzimas que intervienen en la asimilación del N, al exceso de Cu, especialmente en altramuz. Las actividades GS, GOGAT y AAT en los nódulos de altramuz, disminuyen al aumentar la dosis de Cu en el medio de cultivo. Sin embargo en los de soja, los niveles de Cu aplicados no modifican la actividad AAT ni GOGAT, pero disminuye la actividad GS y aumenta la de la enzima ICDH (Tabla 3). Algo similar observan Gálvez y col. (2005) en nódulos de guisante de plantas cultivadas con déficit hídrico, mientras que Gordon y col. (1997) detectan un descenso de la actividad GOGAT pero no de la AAT en nódulos de soja bajo estas mismas condiciones. En nódulos de judía, el estrés provocado por la oscuridad también reduce la actividad de las enzimas implicadas en la asimilación del NH₄⁺ (Gogorcena y col., 1997).

En los resultados de este capítulo, se describe el efecto perjudicial de dosis elevadas de Cu (192 µM) sobre la estructura y ultraestructura de los cloroplastos de ambas especies vegetales, lo que puede afectar a la tasa de fotosíntesis, y por consiguiente, reducir la transferencia a los nódulos de esqueletos carbonados necesarios para la respiración bacteroidal y asimilación del N. En este trabajo, se ha calculado la exportación de C, estimado como el contenido total de C en las plantas (Tabla VI.6 del apéndice). Un resumen de los % de variación en cada dosis de Cu, respecto al control se muestran en la Tabla 7. En los vástagos de altramuz y soja, el contenido de C disminuye con la dosis de Cu aportada, siendo los descensos más acusados en las hojas de altramuz del tratamiento 192 µM Cu. Por el contrario, las

dosis de Cu utilizadas apenas afectan al contenido de C en las raíces de ambos cultivos. A pesar de los datos anteriores, parece que el flujo de compuestos de C a los nódulos de altramuz, no se encuentra alterado por las dosis de Cu, dado que casi no varían las actividades de las enzimas relacionadas con el metabolismo carbonado. En soja, se aprecia una disminución de la actividad SS y UDPGPPasa, así como un aumento de la PEPC.

Tabla 7. Porcentajes de variación del contenido de C en órganos de plantas noduladas de altramuz y soja cultivadas con 48, 96 y 192 μ M Cu con respecto al control (1,6 μ M Cu).

Dosis de Cu (μ M)	Órganos			
	Hojas	Tallos	Vástago	Raíz
<i>Altramuz</i>				
48	27,4↓	=	17,4↓	=
96	52,0↓	25,0↓	44,0↓	=
192	354,2↓	46,4↓	68,7↓	14,2↓
<i>Soja</i>				
48	18,7↓	=	=	34,2↑
96	50,7↓	42,0↓	47,4↓	=
192	59,6↓	55,0↓	57,9↓	=

Gouia y col. (2003) observan que el Cd estimula la actividad de la enzima PEPC en judía, lo cual atribuyen a un reajuste en la coordinación del metabolismo nitrogenado y carbonado. Arrese-Igor y col. (1999) relacionan la inhibición de la fijación de N₂, en condiciones de sequía, con una reducción en el flujo de C al nódulo. Sin embargo Naya y col. (2007) observaron que el descenso de la expresión y actividad SS no es la causa de la inhibición de la FBN en alfalfa. En este trabajo, la reducción de la actividad SS en los nódulos de soja tampoco parece ser la causa de la inhibición de la fijación de N₂, ya que las actividades de las enzimas implicadas en el metabolismo de N apenas se ven alteradas. En altramuz, el efecto negativo que ejerce el Cu sobre la fijación de N₂ podría ser atribuido entre otras causas, a una alteración en el proceso de asimilación del N y a la producción de malato.

Por otra parte, la inhibición del crecimiento y de la FBN puede estar ocasionada por la acumulación de Cu en los tejidos vegetales, así como por desequilibrios nutricionales y alteraciones ultraestructurales en los nódulos y en el aparato fotosintético. En ambas leguminosas, la concentración de Cu en la planta y en el nódulo aumenta a medida que lo hace la dosis del MP (Figs. 2 y 11). Aunque la planta de soja, acumula aproximadamente el doble de Cu en los nódulos y la raíz que la de altramuzy y en torno a la mitad en las hojas. Sin embargo ambas leguminosas presentan concentraciones similares en los tallos. Esto indicaría que la planta de altramuzy transporta mayor cantidad de Cu a la parte aérea que la de soja. Además, cabe destacar que los valores de concentración de Cu encontrados en las hojas de las plantas noduladas de altramuzy y soja tratadas con dosis ≥ 48 y ≥ 96 μM de Cu, respectivamente, se encuentran dentro del intervalo de toxicidad establecido por diversos autores (Reuter y Robinson, 1997). Las tasas de acumulación de Cu en altramuzy y soja tratadas con 192 μM alcanzan, respectivamente, los valores siguientes: $132,1 \pm 1,5$ y $67,1 \pm 1,8$ mg kg^{-1} MS en hojas; $439,6 \pm 40,1$ y $810,8 \pm 45,5$ mg kg^{-1} MS en raíz y $110,1 \pm 4,6$ y $247,7 \pm 9,8$ mg kg^{-1} MS en nódulos.

Las pautas de distribución de Cu en los órganos de las plantas muestran algunas diferencias inter-específicas. En altramuzy, con independencia de la dosis de Cu aportada, es raíz > hojas > nódulos > tallos. En soja, las plantas procedentes del tratamiento control presentan la distribución siguiente: raíz > hojas > tallos > nódulos, mientras que en las tratadas con dosis elevadas de Cu aumenta considerablemente la concentración de Cu en los nódulos (raíz > nódulos > hojas > tallos). En acacia blanca sometida a estrés por Cu, se observa el mismo patrón de acumulación que en soja (Georgiev y col., 1996). Sin embargo, el Cd en altramuzy se acumula en el nódulo en un orden de magnitud mayor que en raíz, y este a su vez, mayor que en vástago (Carpena y col., 2003).

El que los nódulos de soja procedentes del tratamiento control acumulen poco Cu, se manifiesta claramente en los resultados del microanálisis. Ya que los % de señal de Cu están por debajo del nivel de detección del equipo (Fig. 3). Los resultados

de LTSEM-EDXMA ponen de manifiesto que en la planta de altramuz, una mayor proporción de Cu se localiza en la pared celular mientras que en soja se deposita en la vacuola, excepto en el córtex externo que lo hace en la pared celular. El Cd en los nódulos de altramuz, también se localiza fundamentalmente en la pared de la célula vegetal, lo que constituye uno de los principales mecanismos de detoxificación del MP en el nódulo (Carpena y col., 2003). A nivel de tejidos, los nódulos de altramuz cultivados con 1,6 μ M de Cu localizan principalmente este metal en el córtex externo, observándose un gradiente decreciente desde el exterior hacia el interior de este órgano, en cambio en los tratados con 192 μ M Cu, el MP se deposita en las regiones más internas como son el córtex interno y la zona infectada. Por el contrario, en los nódulos de soja expuestos a la dosis más alta de Cu se aprecia una tendencia decreciente de Cu desde el exterior hacia el interior, siendo el córtex externo y el medio, las regiones que almacenan una mayor proporción de Cu (Sánchez-Pardo y col., 2010).

Por otro lado, diversos autores observan reducciones en el contenido de nutrientes en leguminosas sometidas a situaciones de estrés por MPs. Así, Kopittke y col. (2007) observan descensos de Ca, Mg, Fe y Zn en hojas de caupí tratadas con niveles elevados de Cu. Del mismo modo, Zornoza y col. (2002) encuentran reducciones de Mn, Cu y Zn en hojas de plantas noduladas de altramuz tratadas con Cd. También se ha observado un aumento de Cu y un descenso de Ni en nódulos de altramuz crecidos con Cd (Carpena y col., 2003). En este trabajo, el estrés por Cu en plantas noduladas de altramuz y soja causa una reducción muy intensa de Fe en todos los órganos de la planta, pero especialmente en las hojas, con valores en las tratadas con las dosis más altas de Cu, que se pueden considerar deficientes (Reuter y Robinson, 1997). Otros micronutrientes también se reducen por el exceso de Cu, destacando por su cuantía el efecto sobre el Mn en los órganos de altramuz y el Ni en los de soja (Tablas 5 y 6). Además, en los nódulos de plantas de soja crecidas con dosis elevadas de Cu se acumulan niveles más elevados de Mn, Zn y Ni que en los de las plantas crecidas con dosis bajas de Cu (Tabla 6).

Entre las alteraciones estructurales provocadas por el exceso de Cu en los nódulos, destaca fundamentalmente el aumento del contenido de glicoproteínas en los espacios intercelulares de la corteza media en nódulos de altramuza y soja (Figs. 5 y 6). El aumento de glicoproteínas produce la oclusión de los espacios intercelulares de esta zona. Además se observó mayor vacuolización de las células infectadas y la presencia de precipitados en las vacuolas de las células de la zona infectada de los nódulos de soja (Fig. 6). Según Georgiev y col. (1996), el aumento en la concentración de Cu podría afectar a la cantidad y a las propiedades de las glicoproteínas, y reducir los espacios intercelulares entre las células del córtex en nódulos de acacia blanca. En general en condiciones de estrés, las glicoproteínas aumentan en los espacios intercelulares limitando la difusión de O₂ a la zona infectada, como se ha visto en nódulos de altramuza sometidos a oscuridad, nitrato, salinidad, sequía (Fernández-Pascual y col., 2007) y Cd (Carpena y col., 2003), sin embargo el efecto contrario se observa en nódulos de altramuza en presencia de glifosato (de María y col., 2005). El descenso de la concentración de O₂ en la zona de infección, reduce la actividad nitrogenasa, y por tanto la fijación de N₂, el contenido de proteínas y los compuestos nitrogenados del nódulo (Guasch y col., 2001).

En cuanto a las alteraciones ultraestructurales, en los nódulos de altramuza tratados con 192 µM Cu se aprecia principalmente degradación y en algunos casos ruptura de la membrana peribacteroidal y un aumento de vesículas en el citosol (Fig. 8). Resultados similares se ha observado en nódulos de esta leguminosa al aportar niveles elevados de glifosato (de María y col., 2005). Según estos autores, la ausencia de la membrana peribacteroidal, podría afectar bastante a la eficiencia y al funcionamiento nodular, debido a que el transporte de solutos entre el citosol y el bacteroide tiene lugar a través de esta membrana. Además, el proceso de intercambio de sustancias y señales entre los dos simbioses, también se podría encontrar alterado, lo que limitaría el transporte de los carbohidratos aportados por la planta y dificultaría la cantidad de N₂ fijado por el bacteroide. Asimismo, la ruptura o desintegración de las membranas peribacteroidales podría afectar a la turgencia de las células y provocar una alteración de la presión en los tejidos del nódulo de

altramuz. En esta especie vegetal, la zona infectada únicamente tiene células infectadas, no contiene células intersticiales como sucede en la zona de infección de los nódulos de soja.

En los nódulos de soja, el estrés de Cu provoca una degeneración de la membrana bacteroidal, pero conserva la membrana peribacteroidal (Fig. 9). Estas alteraciones también se han observado en nódulos de altramuz con senescencia natural e inducida por oscuridad (Hernández-Jiménez y col., 2002) y en nódulos de plantas tratadas con nitrato (de Lorenzo y col., 1990) y herbicidas (Fernández-Pascual y col., 1988; de María y col., 2005). Por tanto en los nódulos de ambas leguminosas, el exceso de Cu (192 µM) afecta a la estructura de los simbiosomas y por consiguiente, a la eficiencia y funcionalidad de los nódulos.

Los cambios en la ultraestructura de los cloroplastos de las hojas tratadas con exceso de Cu (192 µM), se han descrito ampliamente en el apartado de resultados. Además, la alteración del aparato fotosintético de las hojas de altramuz y soja también se había puesto de manifiesto en los resultados comentados en la sección 1.3 del capítulo IV. Según Barceló y Poschenrieder (2004) es frecuente observar daños en la estructura de los cloroplastos a causa de niveles elevados de MPs. Las alteraciones producidas podrían ser consecuencia de su acción sobre las membranas, a desequilibrios osmóticos, a la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o bien a estados deficientes de determinados nutrientes. Alteraciones estructurales similares a las obtenidas en este estudio se han encontrado en cloroplastos de hojas de altramuz (Vázquez y col., 2007), guisante (McCarthy y col., 2001) y cebada y maíz (Puertas-Mejía y col., 2010) bajo estrés por Cd. Shiyab y col. (2009) detectaron un descenso del número de cloroplastos y gránulos de almidón en las hojas de *Brassica juncea* tratadas con Hg. Alteraciones estructurales en los cloroplastos de plantas de altramuz cultivadas con herbicidas también se han observado (de María y col., 2005 y referenciadas en este artículo).



Capítulo VII

1.- Resultados del estudio comparativo entre fijación y no fijación de N₂: Respuestas de altramuz y soja frente al exceso de Cu

1.1. Absorción, acumulación y translocación de Cu

La Fig. 1 muestra la absorción neta de Cu en plantas noduladas y no noduladas de altramuz y soja tratadas con 1,6 μM y exceso de Cu. En condiciones de FBN, la cantidad de Cu absorbido por las plantas de altramuz tratadas con 1,6 y 24 μM Cu, es 3 y 7 veces más alta, respectivamente, que en las cultivadas sin FBN. En soja, se observa un comportamiento similar, multiplicándose casi por 7 (1,6 y 48 μM) al comparar los valores de absorción neta de Cu que presentan las plantas inoculadas frente a las que lo están.

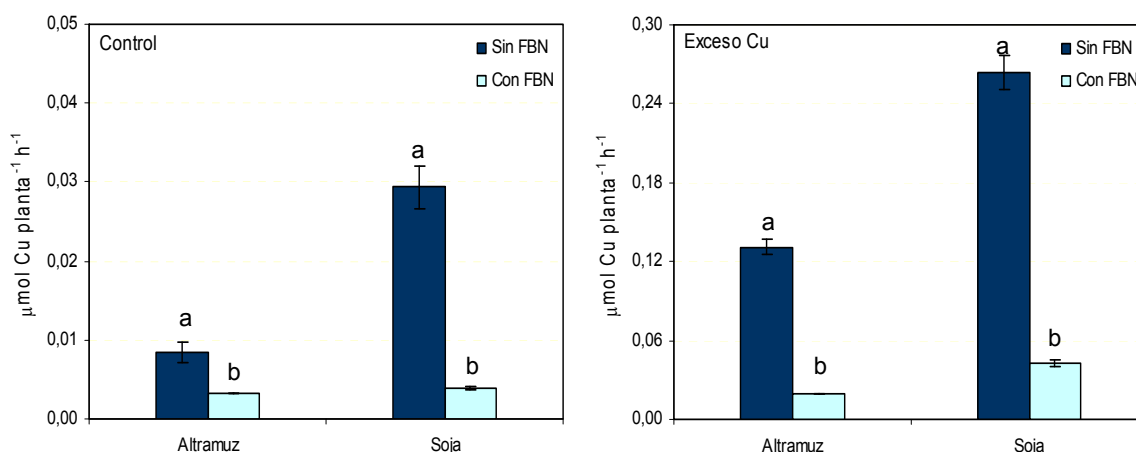
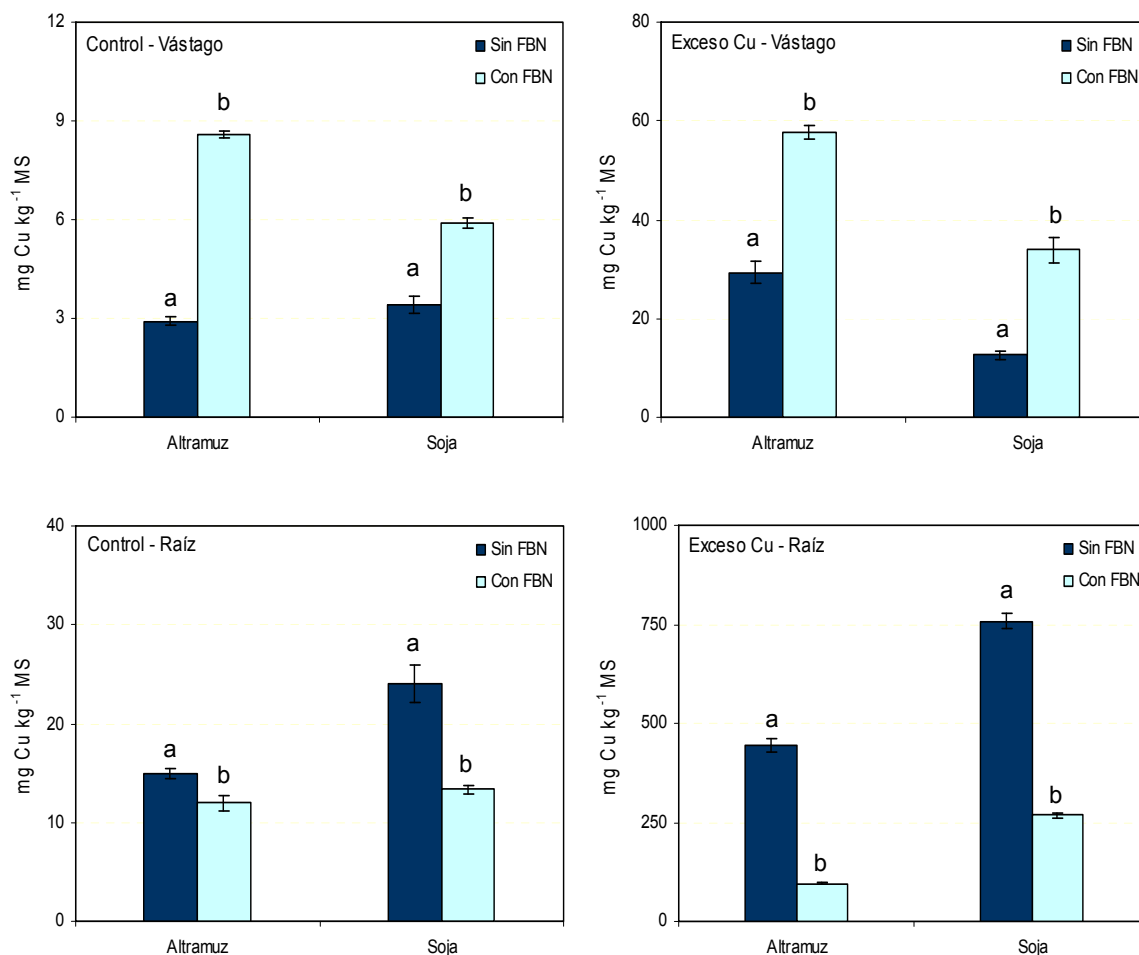


Fig. 1. Absorción neta de Cu en plantas de altramuz y soja con y sin FBN y cultivadas durante 35 días con 1,6 μM y exceso de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Los resultados de acumulación de Cu en el vástago y la raíz de plantas de altramuz y soja noduladas y sin nodular cultivadas con 1,6 μM y exceso de Cu, se muestra en la Fig. 2. Se detecta en ambas dosis de Cu, un aumento de la acumulación de Cu en el vástago de las plantas sometidas a FBN; siendo, para la dosis más alta de Cu, en torno al doble en altramuz y al triple en soja. Lo contrario se observa en la raíz,

ya que la FBN, promueve un descenso para ambas dosis de Cu, con disminuciones del 79% y 65% en las plantas de altramuz y soja, respectivamente, tratadas con exceso de



Cu.

Fig. 2. Concentración de Cu en el vástago y raíz de plantas de altramuz y soja con y sin FBN y cultivadas durante 35 días con 1,6 μ M y exceso de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Con respecto a los porcentajes de translocación de Cu (Fig. 3), se observan valores más altos en las plantas cultivadas con FBN, con independencia de la dosis de Cu en el medio de cultivo; llegando las plantas de altramuz y la de soja crecidas con exceso de Cu y en simbiosis, a transportar a la parte aérea en torno a 20 y 7 veces más cantidad de Cu, respectivamente, que las cultivadas sin FBN.

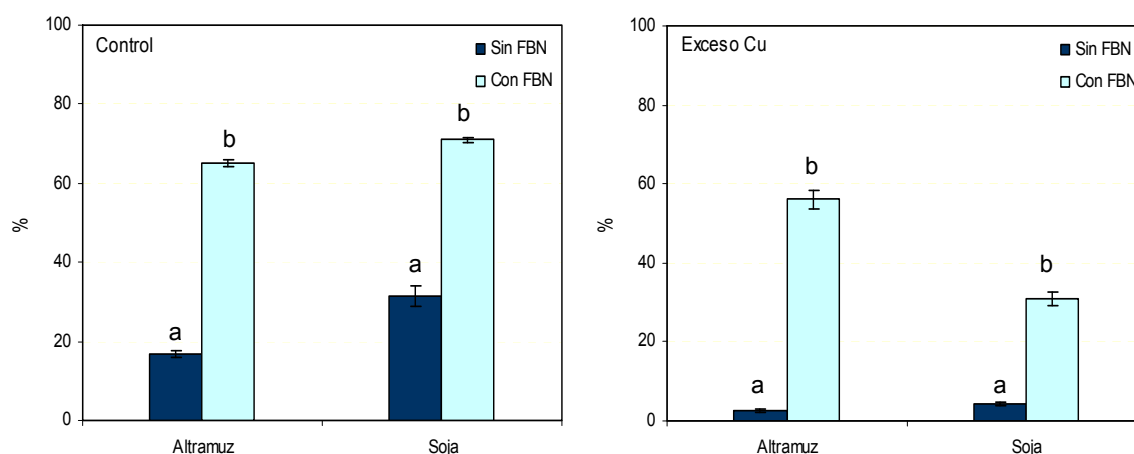


Fig. 3. Porcentajes de translocación de Cu en plantas de altramuz y soja con y sin FBN y cultivadas durante 35 días con 1,6 μ M y exceso de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

1.2. Tasas de crecimiento relativo

Los porcentajes de crecimiento relativo del vástago y la raíz de plantas de altramuz y soja con y sin FBN, cultivadas con 1,6 μ M y exceso de Cu se muestran en la Fig. 4. El exceso de Cu reduce en menor cuantía, el crecimiento relativo del vástago de las plantas que están en condiciones de FBN, especialmente el de altramuz. Además, el efecto negativo que tiene el exceso de Cu sobre el crecimiento radicular de las plantas sin FBN, desaparece cuando están fijando N₂, ya que se observan % de crecimiento relativo de las raíces más elevados, que los del control.

1.3. Exportación de N y concentración de proteínas

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la exportación de N (calculado como contenido total) en la parte aérea y subterránea de plantas noduladas y no noduladas de altramuz y soja cultivadas con 1,6 μ M y exceso de Cu. La exportación de N se reduce en los órganos de las plantas crecidas con FBN. Este hecho es más acentuado en altramuz que en soja y, especialmente, afecta al contenido de N en el vástago. La disminución en la exportación de N, está motivada por las diferencias en

la producción de biomasa, ya que el crecimiento de las plantas ha sido más elevado en las crecidas con NO₃⁻ como fuente de N.

Por otro lado, el exceso de Cu en las plantas cultivadas sin FBN, también reduce la exportación de N. Este hecho es más intenso en el vástago (6 veces), que en la raíz de altramuza (2 veces). En soja, disminuye alrededor de 4 veces tanto en el vástago como en la raíz.

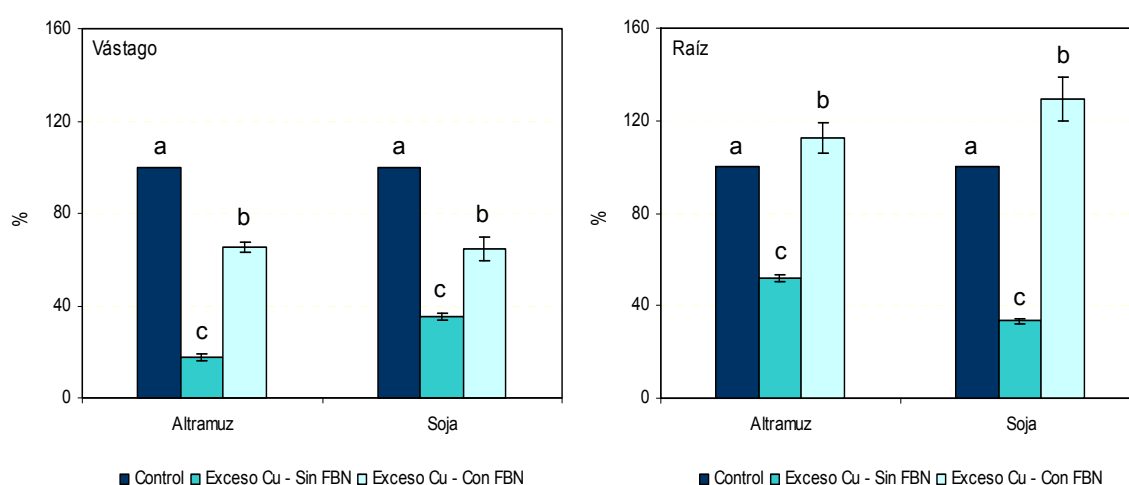


Fig. 4. Porcentajes de crecimiento relativo del vástago y la raíz de plantas de altramuza y soja con y sin FBN, cultivadas durante 35 días con 1,6 μM y exceso de Cu. Las barras verticales indican (±) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

La concentración total de proteínas solubles en hojas y raíces de plantas de altramuza y soja cultivadas con 1,6 μM y exceso de Cu, en condiciones o no de fijación de N₂, se observa en la Fig. 5. En ausencia de FBN, el exceso de Cu promueve en comparación a los valores del tratamiento control, un descenso significativo del contenido de proteínas tanto en las hojas (31%) como en las raíces de altramuza (49%). En soja, la dosis de Cu no modifica la concentración de proteínas solubles. Bajo condiciones de fijación de N₂, el suministro de dosis altas de Cu, aumenta en comparación con los datos del tratamiento control, la concentración de proteínas en las hojas de altramuza (2,4 veces) y la reduce en raíz (22%). En soja, el exceso de Cu no

modifica el contenido de proteínas en las hojas, en cambio la incrementa en raíz (1,2 veces).

Por otro lado, las hojas de las plantas de altramuz con FBN, dan unos valores de proteínas más elevados que aquellas que proceden de las plantas cultivadas sin FBN. En raíz, se observa una reducción de la concentración de proteínas solubles en las hojas y raíces de las plantas en simbiosis (Fig. 5).

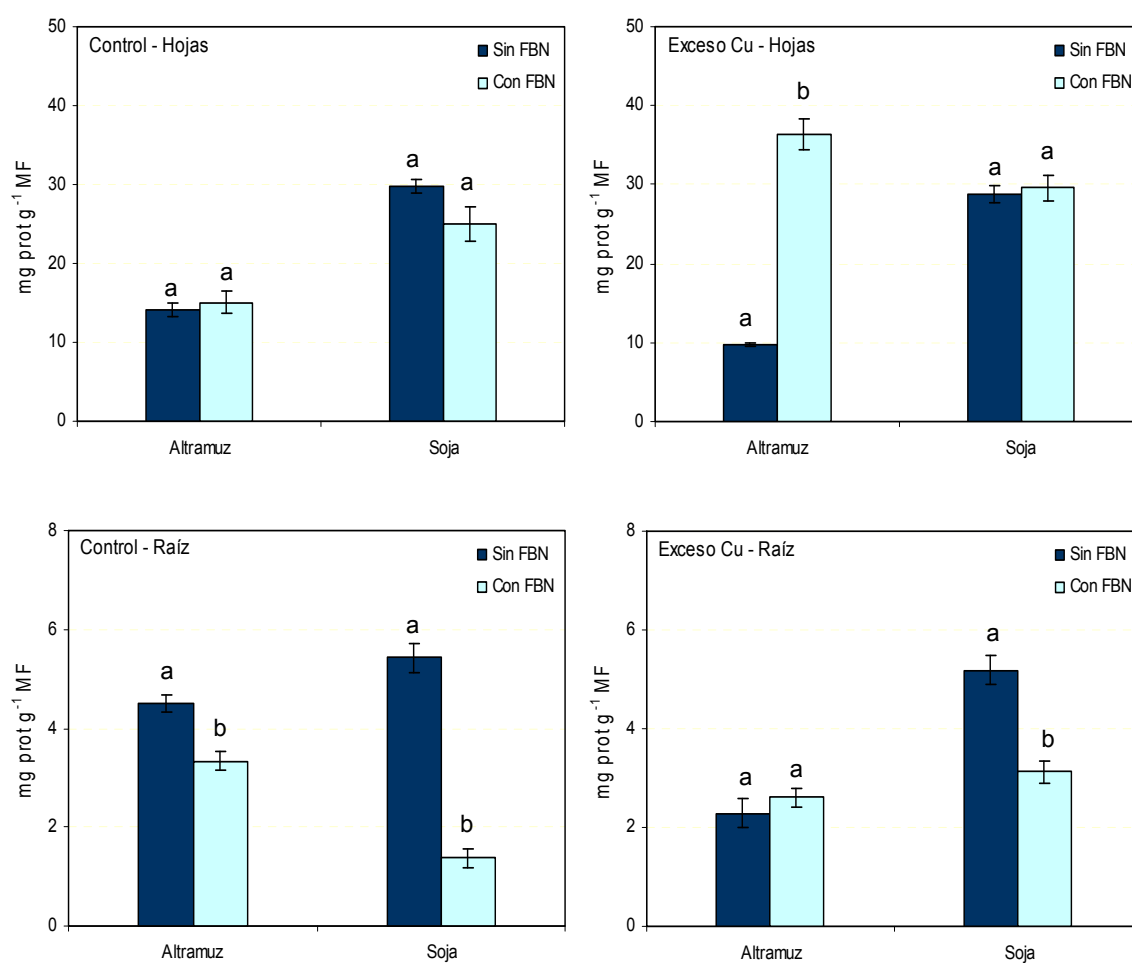


Fig. 5. Contenido de proteínas solubles en hojas y raíces de plantas de altramuz y soja, con y sin FBN y cultivadas durante 35 días con 1,6 μ M y exceso de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Tabla 1. Exportación de N (mmol planta⁻¹) en el vástago y la raíz de plantas de altramuza y soja con o sin FBN y cultivadas durante 35 días con 1,6 µM y exceso de Cu. Los resultados son las medias ± el E.T. (*n* = 4). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA (*P* < 0,05)

	Tratamientos de Cu			
	Control	Exceso de Cu	Control	Exceso de Cu
	Sin FBN		Con FBN	
Vástago	Altramuz			
	5,55 ± 0,29 ^a	1,70 ± 0,05 ^b	0,92 ± 0,06 ^b	1,26 ± 0,02 ^b
Raíz	3,24 ± 0,19 ^a	0,23 ± 0,01 ^b	1,74 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,02 ^b
Vástago	Soja			
	22,32 ± 1,15 ^a	2,86 ± 0,17 ^b	6,49 ± 0,07 ^a	2,37 ± 0,24 ^b
Raíz	9,81 ± 0,39 ^a	0,28 ± 0,01 ^b	2,45 ± 0,08 ^a	0,42 ± 0,04 ^b

1.4. Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del N

Los resultados de las actividades de diversas enzimas relacionadas con el metabolismo de N en hojas y raíces de plantas noduladas y sin nodular de altramuza y soja crecidas con 1,6 µM y exceso de Cu, se muestran en las Figs. 6 y 7, respectivamente. En ausencia de FBN, el exceso de Cu reduce la actividad de las enzimas GOGAT (6%), GS (17%) e ICDH (21%) en las hojas de altramuza, pero no afecta a la actividad AAT. Con FBN, el exceso de Cu no modifica las actividades de las tres primeras enzimas mencionadas, pero aumenta 1,6 veces la de la enzima GS (Fig. 6). En cuanto a la raíz, la dosis más alta de Cu produce un descenso de las actividades GS (96%) e ICDH (46%) en las de las plantas de altramuza no noduladas, pero no afecta significativamente a las actividades de las enzimas AAT y GOGAT. En las raíces de las plantas noduladas de altramuza, no se ha detectado actividad GS en ninguna de las dosis suministradas. Además, el exceso de Cu, promueve una reducción de aproximadamente un 24%, de las actividades AAT, GOGAT e ICDH (Fig. 6).

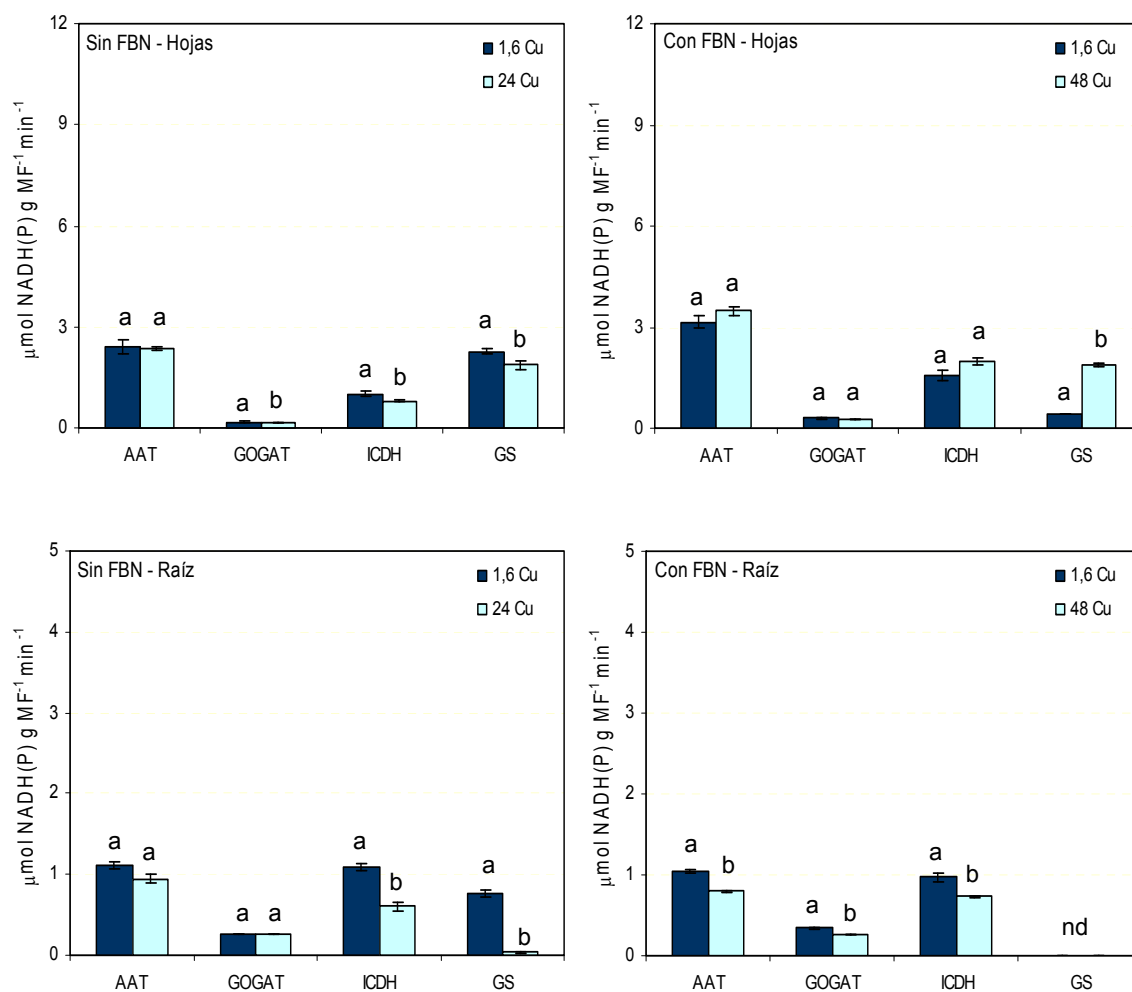


Fig. 6. Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de N en hojas y raíces de plantas de altramuz con y sin FBN, cultivadas durante 35 días con 1,6 μM y exceso de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Con respecto a las hojas de soja, el aporte de 24 μM a las plantas crecidas sin FBN, aumenta 1,2 veces las actividades enzimáticas AAT e ICDH, disminuye la de GS (10%) y no modifica la de la GOGAT. En raíz, el exceso de Cu no promueve ningún efecto (Fig. 7). En las hojas de las plantas de soja noduladas, el suministro de 48 μM Cu, aumenta la actividad AAT (1,4 veces), disminuye la de GS (35%) y no altera la de GOGAT ni la de ICDH, en cambio, estimula las actividad de estas enzimas en raíz: 1,7; 1,1; 1,8 y 1,9 veces la de AAT, GOGAT, ICDH y GS, respectivamente (Fig. 7).

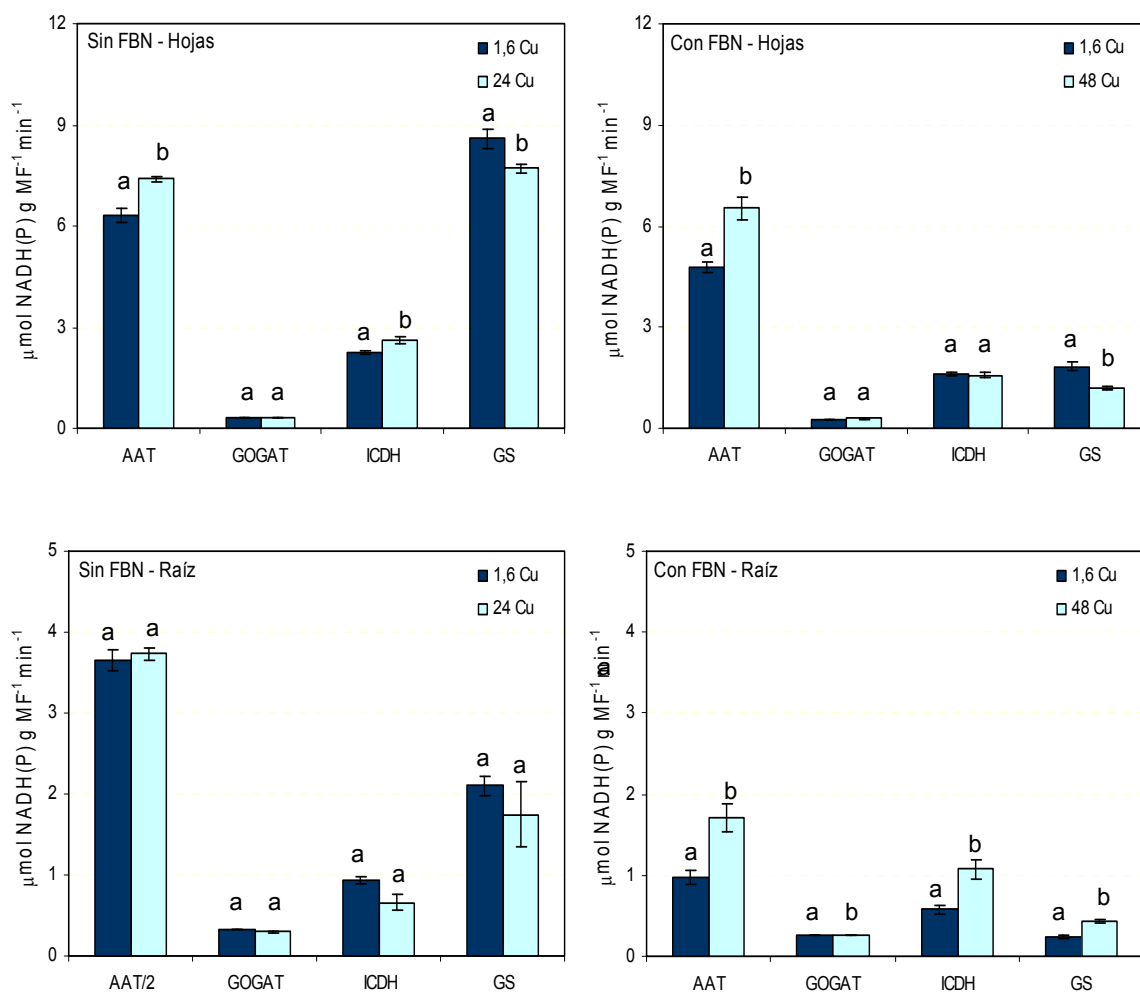


Fig. 7. Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de N en hojas y raíces de plantas de soja, con y sin FBN, cultivadas durante 35 días con 1,6 μM y exceso de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

1.5. Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del C

Las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de C en hojas y raíces de plantas de altramuz y soja noduladas y sin nodular y tratadas con 1,6 μM y exceso de Cu, se muestran en las Figs. 8 y 9, respectivamente. En ausencia de FBN, el exceso de Cu promueve en las hojas de altramuz un descenso significativo de la actividad de las enzimas SS (13%) y de la UDPGPPasa (36%), pero no afecta a la MDH ni a la PEPC. En raíz, causa disminuciones de las cuatro enzimas estudiadas (SS - 34%; MDH - 23%; PEPC - 60% y UDPGPPasa - 55%). En las hojas de las plantas inoculadas, el

aporte de 48 μM Cu, exalta 1,5 veces, las actividades enzimáticas de MDH, PEPC y UDGPPAsa pero no afecta a la SS. En raíz, se observan descensos de SS, MDH, y UDGPPAsa; siendo en este caso la actividad de la enzima PEPC la que permanece inalterada (Fig. 8). Además, cabe destacar que las actividades enzimáticas detectadas en ambas condiciones de cultivo, son mayores en hojas que en raíz.

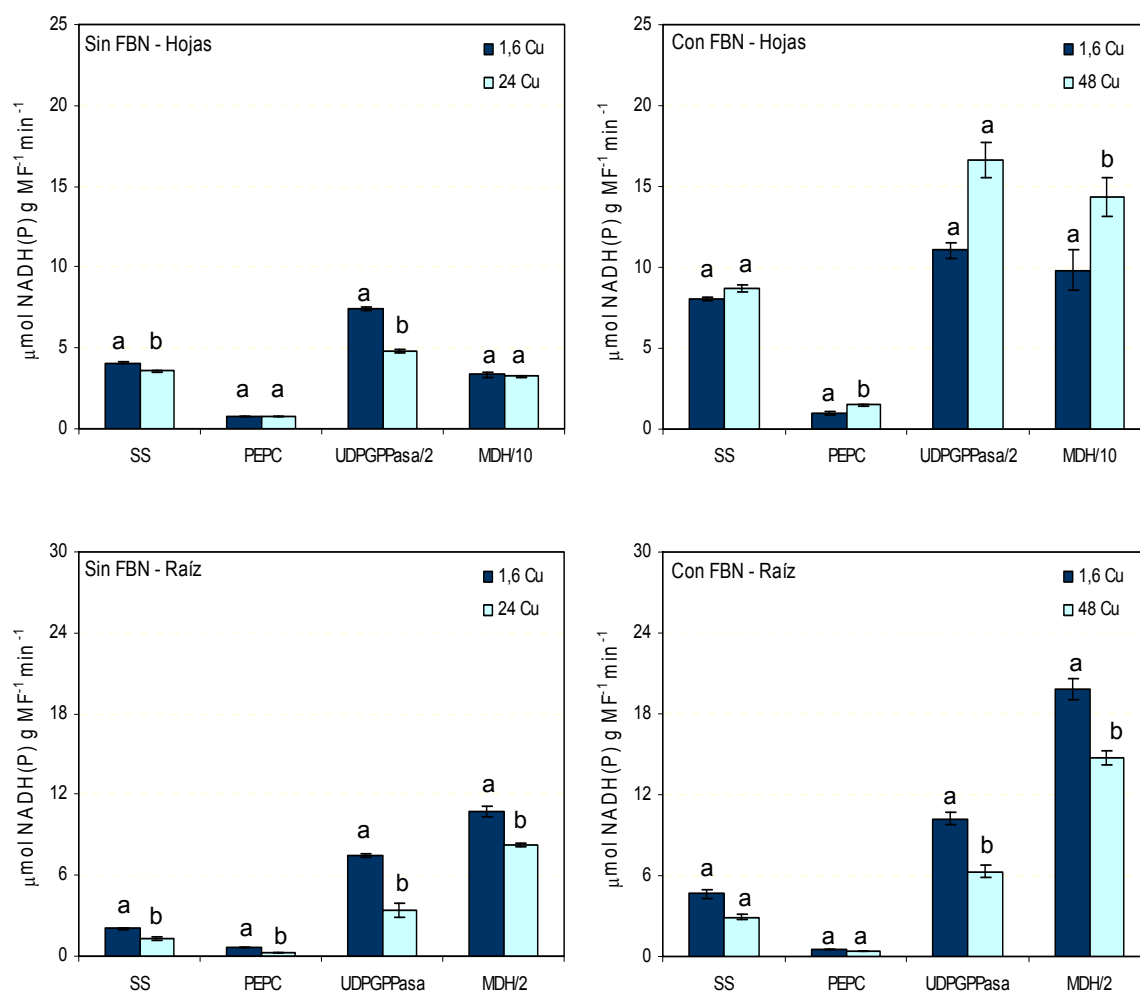


Fig. 8. Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de C en hojas y raíces de plantas de altamuz con y sin FBN y cultivadas durante 35 días con 1,6 μM y exceso de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Por lo que respecta a la soja, en las plantas sin nodular, el aporte de 24 μM no modifica las actividades enzimáticas analizadas en hojas ni en raíz (Fig. 9). Sin

embargo, en las hojas de las plantas noduladas aumenta 1,4 y 2 veces la actividad de la MDH y UDPGPasa, respectivamente; disminuye un 41% la de PEPC y no altera la de SS. En raíz, el exceso de Cu exalta entre 1,4 y 1,9 veces la actividad enzimática de las cuatro enzimas estudiadas. Además, en ausencia de fijación de N₂, los valores de las actividades enzimáticas que presentan las plantas de soja son similares en hojas y en raíz, mientras que en simbiosis, son mayores los valores encontrados en la parte aérea de la planta.

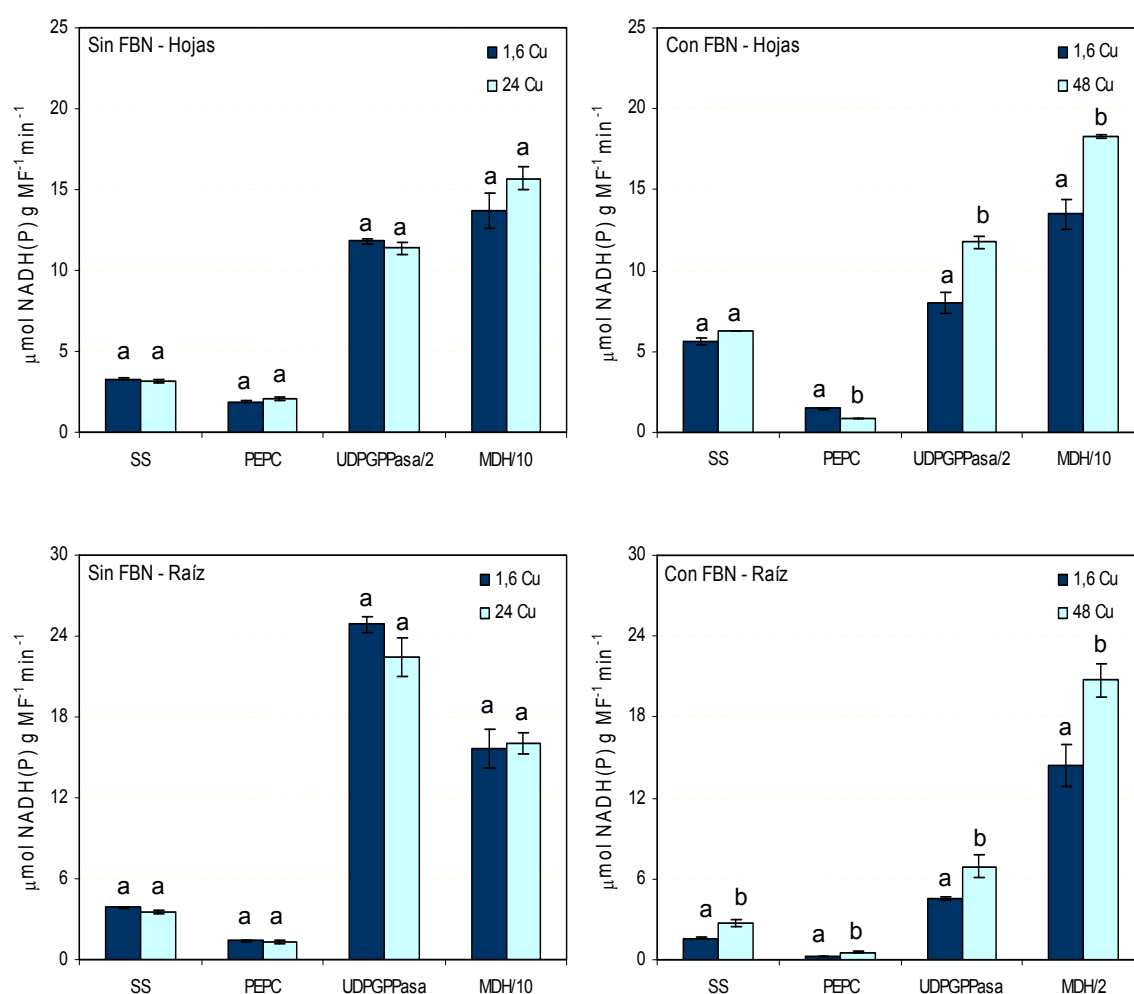


Fig. 9. Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de C en hojas y raíces de plantas de soja con y sin FBN y cultivadas durante 35 días con 1,6 μM y exceso de Cu. Las barras verticales indican (\pm) el E.T. de la media ($n = 4$). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

1.6. Indicadores de estrés

Los resultados del contenido de MDA y –SH totales en hojas y raíces de plantas de altramuzy y soja noduladas y sin nodular, cultivadas con 1,6 µM y exceso de Cu se recogen en la **Tabla 2**. Como se había comentado anteriormente, el exceso de Cu promueve una exaltación en la producción de MDA y en el contenido de –SH en los órganos de las plantas no noduladas y tratadas con un exceso de Cu. Excepto en la raíz de soja, en la que no se observan diferencias en función de la dosis de Cu suministrada. En las hojas de las plantas de altramuzy con FBN, se observa la misma respuesta que en las tratadas con NO₃⁻. Los aumentos en comparación al control, son 1,5 y 1,1 veces para el MDA y –SH, respectivamente. En cambio en raíz, disminuye un 35% el nivel de –SH y no varía la producción de MDA. En las hojas y raíces de las plantas noduladas de soja, el MDA aumenta significativamente al suministrar 48 µM Cu (2,7 veces en hojas y 2,3 veces en raíz) que en las tratadas con 1,6 µM Cu. En cuanto al nivel de –SH, no se observan diferencias significativas entre los dos tratamientos de Cu suministrados.

Tabla 2. Contenido de MDA y -SH (nmol g⁻¹ MF) en hojas y raíces de plantas de altramuzy y soja con y sin FBN y cultivadas durante 35 días con 1,6 µM y exceso de Cu. Los resultados son las medias ± el E.T. (n = 4). La significación de las medias para especies vegetales y condiciones de cultivo se ha establecido a partir del ANOVA (P < 0,05)

Órgano		Dosis de Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	48
		Sin FBN		Con FBN	
Hojas	MDA	31,45 ± 0,16 ^a	60,94 ± 1,05 ^b	13,66 ± 1,50 ^a	20,54 ± 0,28 ^b
	-SH	581,55 ± 6,32 ^a	727,63 ± 6,91 ^b	473,85 ± 18,52 ^a	543,88 ± 1,47 ^b
Raíz	MDA	37,96 ± 1,09 ^a	65,34 ± 0,79 ^b	21,38 ± 0,45 ^a	23,93 ± 1,08 ^a
	-SH	97,61 ± 3,92 ^a	158,92 ± 2,85 ^b	94,72 ± 6,29 ^a	63,31 ± 10,31 ^b
Hojas	MDA	46,45 ± 1,03 ^a	62,84 ± 0,58 ^b	31,50 ± 3,32 ^a	84,65 ± 3,69 ^b
	-SH	728,24 ± 2,39 ^a	860,22 ± 12,14 ^b	620,22 ± 19,63 ^a	700,04 ± 46,00 ^a
Raíz	MDA	38,54 ± 0,82 ^a	41,77 ± 0,93 ^b	24,66 ± 0,73 ^a	56,40 ± 3,59 ^b
	-SH	239,46 ± 7,07 ^a	227,33 ± 3,56 ^a	118,08 ± 4,08 ^a	114,45 ± 2,50 ^a

2.- Discusión del estudio comparativo entre fijación y no fijación de N₂: Respuestas de altramuz y soja frente al exceso de Cu

La FBN es el principal proceso de aporte de N en los ecosistemas naturales y tiene una importancia capital en la Agricultura, pues es la manera más efectiva, barata y menos contaminante para mejorar la fertilidad del suelo, si se compara con la fertilización química y orgánica (Carpena y col., 2006). Numerosos trabajos ponen de manifiesto el efecto perjudicial de niveles elevados de contaminantes, de origen antropogénico, sobre la actividad microbiana y la fertilidad del suelo (McGrath y col., 1995). La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es más eficiente que otros sistemas de fijación de N y, en esta línea, existen trabajos que ponen de manifiesto el efecto negativo de la contaminación por MPs sobre el proceso de FBN (Broos y col., 2005; Giller y col., 2009).

La asociación simbiótica rizobio-leguminosa mejora la fertilidad del suelo, y en muchos casos, posee alta resistencia a diversos tipos de estrés abióticos (Carpena y col., 2006; Fernández-Pascual y col., 2007). Ello le confiere una capacidad potencial para ser utilizada en fitotecnologías de recuperación y revegetación de suelos contaminados con elementos traza (Frérot y col., 2006). Además se ha visto que en medios no contaminados, las leguminosas facilitan la instalación de otros grupos vegetales, algunos de ellos dotados de unas características intrínsecas muy positivas para ser usados en tecnologías combinadas para la restauración de emplazamientos contaminados.

Por tanto, con la finalidad de evaluar el posible efecto protector de la simbiosis rizobio-leguminosa ante situaciones de estrés por Cu y evaluar las posibles estrategias implicadas en ello, se llevaron a cabo una serie de experimentos en hidroponía con y sin fijación de N₂ y en presencia de niveles normales y elevados de Cu. En los ensayos realizados sin FBN, se ha seleccionado la dosis de 24 µM como exceso de Cu, ya que en experimentos previos (capítulos II y III), se había observado que el umbral de toxicidad podría estar comprendido entre 16 y 32 µM Cu. De los resultados obtenidos

en los experimentos dosis-respuesta con FBN (capítulo VI) se ha optado por seleccionar la dosis 48 μM Cu, si bien, en este caso, la concentración de Cu realmente disponible para las plantas es ligeramente inferior (39 μM), ya un 20% aproximadamente es retenido por el sustrato de cultivo. Otros autores ([Vázquez y Carpena-Ruiz, 2005](#)) observan % de retención de Cd cercanos al 50% con el mismo sustrato y sistema de cultivo utilizado en este trabajo.

Los resultados comentados en este capítulo VII, van a estar directamente relacionados con las diferentes dosis de Cu puestas a disposición de las plantas, unas cultivadas en hidroponía con sustrato y FBN, y otras sin sustrato y con NO₃⁻ como fuente de N. Así, las tasas de absorción neta de Cu son ostensiblemente más bajas en las plantas cultivadas con FBN que en las que no están fijando ([Fig. 1](#)). Lo cual podría ser atribuido a que a cada planta nodulada del tratamiento control se le ha aportado 0,19 mg, mientras que el suministro de Cu a cada una del tratamiento 48 μM Cu fue de 5,69 mg. En las cultivadas sin FBN, se aportaron 1,07 y 16,01 mg de Cu para las dosis 1,6 y 24 μM Cu, respectivamente. Además, es importante destacar, que tanto en ausencia como en presencia de FBN, la planta de soja absorbe el doble de Cu que la de altramuz ([Fig. 1](#)).

Las diferencias en las tasas de absorción neta están relacionadas con los valores de concentración en las raíces de ambas leguminosas. Así, las raíces de altramuz y soja cultivadas bajo condiciones de FBN, presentan una menor concentración de Cu que las crecidas sin FBN. Sin embargo, la acumulación de Cu en el vástago se acentúa en las plantas noduladas; en este caso, la concentración de Cu en los vástagos de soja y altramuz es el triple y el doble, respectivamente, de los valores que presentan las plantas crecidas en ausencia de FBN ([Fig. 2](#)). Esto coincide con lo observado en los índices de translocación, en donde se observa que en condiciones de fijación de N₂, se incrementan los % de translocación de Cu a la parte aérea de las plantas ([Fig. 3](#)). Parece por tanto, que en las plantas que están fijando N₂ se produce una intensificación del transporte de Cu, más acentuado en altramuz, ya

que esta especie vegetal, acumula aproximadamente 1,7 veces más Cu en el vástago que la soja.

La presencia de niveles elevados de Cu en el medio de cultivo, afecta de forma negativa al crecimiento de las plantas de altramuza y soja, como se ha visto en capítulos anteriores. En este trabajo además se observa, que los % de reducción varían en función de qué las plantas estén sometidas o no, a FBN. Así, el efecto negativo del Cu es menos intenso en las plantas noduladas, en las que incluso se llega a observar, un ligero incremento de la tasa de crecimiento relativo de las raíces de ambas leguminosas en relación a los valores de las plantas control (Fig. 4).

La menor tasa de absorción neta de Cu observada en las plantas noduladas de altramuza y soja, podría ser explicada, en cierta medida, que el crecimiento se vea menos perjudicado por el exceso de Cu. A pesar de ello, las plantas cultivadas sin FBN mostraron, para ambas dosis de Cu, una mayor biomasa que las sometidas a FBN. Lo cual está relacionado también con unas tasas de absorción de nutrientes más altas.

La susceptibilidad de las plantas a la toxicidad de Cu no sólo varía en función de la dosis aplicada, de la especie y del órgano vegetal (Ouzounidou y col., 1995; Burkhead y col., 2009) como se ha comentado en el capítulo III, sino también de las condiciones de cultivo. En este estudio, se han obtenido valores de CTC_{10%} en el vástago de plantas noduladas de altramuza, 3,9 veces superiores a los obtenidos cuando no hay FBN (Capítulo III). En el vástago de soja, los incrementos han sido algo menores, aproximadamente 2,5 veces (Tabla 3). Del examen de los datos, se puede deducir que, para reducir un 10% el crecimiento de las plantas de altramuza y soja cultivadas con FBN, éstas necesitarían acumular concentraciones de Cu más altas en el vástago, que las plantas crecidas sin FBN. Algo similar se observa en las raíces de soja, ya que el valor de CTC_{10%} es aproximadamente el doble del que exhiben las plantas cuando están sometidas a FBN. Lo contrario se detecta en altramuza. Además en ausencia de FBN, ambas especies presentan valores de CTC_{10%} más altos en la raíz que en la parte aérea. Con FBN se detecta algo similar en soja, pero no en altramuza,

en la cual, concentraciones similares de Cu en parte aérea y raíz reducen un 10% el crecimiento de la planta.

Tabla 3. Parámetros de toxicidad (EC₅₀ y CTC_{10%}) en base al peso seco del vástago y raíz de plantas noduladas de altramuz y soja cultivadas durante 35 días con dosis crecientes de Cu. EC₅₀ calculado mediante ajuste a una curva logística estándar de tres parámetros y CTC_{10%} a una polinomial (hojas) y a una recta (raíz) característicos del programa SigmaPlot

Parámetros de toxicidad		
	Vástago	Raíz
<i>Altramuz</i>		
CTC _{10%} (mg Cu kg ⁻¹ MS)	70,8	71,5
EC ₅₀ (μM)	78,6	---
<i>Soja</i>		
CTC _{10%} (mg Cu kg ⁻¹ MS)	40,7	189,7
EC ₅₀ (μM)	78,6	---

Del mismo modo, sería necesario suministrar dosis más altas de Cu al medio de cultivo, para reducir un 50% el crecimiento del vástago y raíz cuando las plantas de altramuz y soja están siendo cultivadas con FBN, que cuando no lo están (Tabla5 del Capítulo III). En ausencia de FBN, el órgano que se ha mostrado más sensible al exceso de Cu ha sido la raíz de altramuz, mientras que en soja, la parte de la planta que se ha mostrado más afectada ha sido el vástago. Sin embargo, con FBN, el vástago de las plantas ha sido el más sensible al exceso de Cu. El valor de la EC₅₀ en las raíces de las plantas noduladas, no se ha podido calcular, ya que las dosis de Cu aportadas apenas afectan al crecimiento de este órgano. Por ello, la utilización, en futuros trabajos, de dosis de Cu > 192 μM Cu permitirá estimar este índice de toxicidad (EC₅₀).

Hay abundantes referencias bibliográficas que muestran el efecto adverso que ejerce el exceso de Cu sobre el metabolismo nitrogenado de las plantas. [Llorens y col. \(2000\)](#) observan, un descenso del contenido total de N principalmente en la raíz de *Vitis vinífera*, así como de NO₃⁻, aminoácidos libres y de la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo del N. [Demirevska-Kepova y col. \(2004\)](#) encuentran

una reducción de la actividad de las enzimas implicadas en la asimilación de NH₄⁺. Una reducción de la actividad de NRasa y un aumento del contenido de aminoácidos libres presentes en las hojas y raíces de *Brassica pekinensis* también se ha observado (Xiong y col., 2006).

En este trabajo, el exceso de Cu promueve una reducción de proteínas solubles en las hojas y raíces de las plantas de altramuza crecidas sin FBN, pero no en las de soja. Al cultivar las plantas de altramuza con FBN, se duplica la cantidad de proteínas solubles en las hojas, aunque se reducen en la raíz. En las hojas de las plantas de soja cultivadas con FBN no se ve un efecto del Cu, mientras que en las raíces disminuyen (Fig. 5 y Tabla VII.5 del apéndice). Algunos autores observan un aumento en el contenido de aminoácidos cuando las plantas están sometidas a estrés por Cu, lo cual, atribuyen a un mecanismo detoxificación (Hall, 2002; Xiong y col., 2006). Asimismo, las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de N (AAT, GS, GOGAT, ICDH), detectadas en las hojas y la raíz de ambos cultivos estudiados, se encuentran en general, más afectadas cuando las plantas son cultivadas sin FBN que cuando están fijando N₂; llegando a observarse más actividad, principalmente en las enzimas de la raíz de soja (Figs. 6 y 7).

Con independencia de que las plantas estén en simbiosis o no, el contenido de N total en las raíces se reduce cuando son cultivadas con exceso de Cu. Aunque este efecto es más ostensible cuando se cultivan sin FBN, ya que parten de contenidos de N más altos (Tabla 1). Por tanto, parece que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa ejerce un efecto protector sobre el metabolismo de N en ambas especies estudiadas. Si bien, la cantidad de N fijado por las plantas noduladas es menor que en las que no lo están, lo cual, podría ser atribuido a un menor desarrollo de la planta.

El exceso de Cu además de promover alteraciones en el metabolismo de N, también provoca variaciones en el metabolismo del C. Algunos autores han observado una reducción de la actividad de las enzimas implicadas en la fijación de CO₂ cuando las plantas son expuestas a estrés por Cu (Hajduch y col., 2001; Demirevska-Kepova y col., 2004). Como en el caso de las enzimas del metabolismo del N, la respuesta del

metabolismo de C a dosis altas de Cu varía en función de que estén siendo cultivadas o no con FBN. El exceso de Cu en las plantas de altramuiz y soja no noduladas, reduce el contenido de C total en la parte aérea y subterránea de la planta, mientras que apenas lo altera o incluso lo aumenta en las noduladas. Al igual que sucede con el N, la cantidad de C exportado por las plantas cultivadas sin FBN es mayor que en las crecidas con FBN, probablemente debido al menor desarrollo de las plantas que están fijando N₂.

En este estudio, además se observa una reducción de las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del C (SS, MDH, PEPC, UDPGPPasa) en las plantas de altramuiz no noduladas al estar sometidas a la dosis más alta de Cu, en cambio no se detecta en las de soja. Bajo condiciones de FBN, se aprecia un incremento de estas actividades enzimáticas al someterlas al estrés por Cu, salvo en la raíz de altramuiz que disminuyen, aunque los descensos son menos intensos (Figs. 8 y 9).

Por otro lado, la presencia de altos niveles de Cu en los tejidos produce la formación de ROS, las cuales pueden causar alteraciones sobre los lípidos, y promover a su vez la formación de -SH para contrarrestar el efecto perjudicial del estrés oxidativo, como se ha observado en los anteriores capítulos. El exceso de Cu dispara la producción de MDA y -SH en las hojas y raíces de altramuiz cultivadas sin FBN. Este hecho también se observa en las hojas de las plantas de altramuiz con FBN pero no en las raíces (Tabla 2). En soja, son mayores los aumentos de MDA detectados en las hojas y las raíces de las plantas noduladas que en las que no lo están. Esto no coincide con lo detectado en -SH, en los que se observa un incremento en las plantas crecidas sin fijación de N₂, en cambio no varían en las cultivadas con FBN. Lo anterior puede sugerir que otro mecanismo de detoxificación esté funcionando para hacer frente al estrés oxidativo.



Consideraciones finales

En general, los metales pesados, están presentes en concentraciones relativamente bajas en la corteza terrestre, los suelos y las plantas. Algunos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de los seres vivos, aunque si superan determinados umbrales, también pueden tener un efecto perjudicial. Hoy en día, la presencia de niveles elevados de metales pesados en los suelos, fundamentalmente debido a actividades antropogénicas, es uno de los temas ambientales que más preocupación genera a la sociedad. Por ello, la caracterización, evaluación y recuperación de un suelo contaminado es uno de los principales retos ambientales al que nos estamos enfrentando y nos enfrentaremos en los próximos años.

El Cu es un elemento habitual en los suelos. Su acumulación se produce principalmente por la aplicación masiva de fungicidas o fertilizantes cúpricos y la utilización de desechos industriales, agrícolas o urbanos contaminados con Cu. A escala mundial, la contaminación por Cu es un serio problema para la agricultura, ya que este metal se acumula en los suelos hasta alcanzar niveles tóxicos para los cultivos. Los límites de normalidad de Cu en los tejidos vegetales son muy estrechos y por ello superado cierto umbral, las plantas manifiestan una serie de alteraciones que causan una reducción del crecimiento y, por tanto, de la productividad. Para mitigar los efectos tóxicos del Cu, comúnmente se recurre a la aplicación masiva de fertilizantes nitrogenados o fosfatados y materia orgánica. Estas alternativas son caras y algunas veces causan efectos secundarios muy negativos, como pueden ser la inmovilización de nutrientes y la aparición de desequilibrios nutritivos.

El Cu es un elemento esencial para los seres vivos ya que es un constituyente indispensable de un gran número de enzimas y agentes redox que intervienen en el metabolismo celular. Para la mayoría de las especies vegetales, la presencia de altas concentraciones de Cu en la rizosfera causa toxicidad, pudiendo provocar una serie de síntomas, entre los que se encuentran clorosis y necrosis en las hojas; reducción de la biomasa e inhibición del crecimiento radicular, descenso en el contenido de clorofilas e interacción con otros nutrientes esenciales. A nivel celular, la toxicidad de

Cu puede inhibir la actividad enzimática de algunas enzimas y la función de las proteínas. Además, causa peroxidación de lípidos, estrés oxidativo, alteraciones en la estructura del cloroplasto y membrana tilacoidal y la modificación de la morfología de los cromosomas durante el proceso de división celular.

Por otro lado, las leguminosas representan un conjunto de cultivos de extraordinaria importancia, debido a que tienen un papel esencial en el desarrollo de una agricultura sostenible y respetuosa con la conservación del medio ambiente. La aplicación masiva de fertilizantes nitrogenados a los suelos agrícolas, ha sido durante mucho tiempo la solución más rápida, pero también más contaminante, para aumentar la concentración de N. La reintroducción de leguminosas en la rotación de cultivos de nuestra agricultura, junto con la utilización de nuevas variedades y técnicas agronómicas, será una de las soluciones que permitirá satisfacer los requerimientos de los agricultores y las demandas de la sociedad. En suelos contaminados, generalmente pobres en nutrientes y materia orgánica, la utilización de leguminosas tiene gran interés ya que facilita la revegetación y favorece el establecimiento de una cubierta vegetal. La vegetación desempeña un papel esencial en la protección del suelo, ya que disminuye la erosión y al mismo tiempo suministra una cantidad apreciable de materia orgánica para la formación de humus.

En esta Tesis Doctoral se ha abordado un amplio estudio, en condiciones controladas, sobre las respuestas y estrategias que se desencadenan en dos leguminosas frente al estrés por Cu. Y aunque se ha investigado mucho sobre la toxicidad de Cu, en esta memoria se ha pretendido obtener una visión global de la dinámica del Cu en plantas de altramuza y soja, cultivadas en condiciones de normalidad y exceso de Cu, con o sin fijación de N₂. Para ello se ha evaluado la absorción, el transporte y los factores de acumulación del Cu. También se ha estudiado en qué órganos, tejidos y compartimentos celulares se deposita el Cu con mayor intensidad y los cambios que se producen ante una situación de exceso. En estas circunstancias, las plantas reaccionan rápidamente intentando desarrollar

diversas estrategias para sobrevivir en estas condiciones adversas. Los cambios más importantes serían a nivel metabólico, que luego generarían alteraciones estructurales y fisiológicas. El desenlace sería una reducción del crecimiento y si el proceso de estrés avanza, al final, ocurriría la muerte de la planta. No obstante, cada especie vegetal reaccionará de una manera distinta, lo cual va a depender, entre otras cosas, del genotipo, del sistema de cultivo, de la dosis y tiempo de exposición, de la etapa de crecimiento, ya que en general, las plantas son más vulnerables en su juventud que cuando alcanzan la etapa adulta.

En una primera fase con el objeto de estudiar diferencias en la tasa de absorción, transporte y distribución del Cu entre las plantas de altramuza y soja, así como en la interacción de este metal con otros nutrientes, se plantearon una serie de experimentos dosis-respuesta a corto y medio plazo sin fijación de N_2 . En cuanto a la absorción de Cu, los parámetros cinéticos obtenidos ponen de manifiesto que las plantas de altramuza y soja muestran una elevada capacidad para absorber Cu y que en todo el intervalo de concentración estudiado, está actuando un mecanismo de absorción activo. Aunque las plantas de altramuza presentan una mayor velocidad de absorción de Cu, pero una menor afinidad por el metal que las de soja. Los valores de K_m y V_{max} de la absorción activa estimados en altramuza son $517,50 \pm 21,81 \mu M$ y $3,20 \pm 0,48 \mu mol Cu g^{-1} MF h^{-1}$, respectivamente. En soja, la K_m da un valor de $97,66 \pm 9,52 \mu M$ y la V_{max} de $1,22 \pm 0,07 \mu mol Cu g^{-1} MF h^{-1}$.

De los ensayos dosis-respuesta a medio plazo se observa que la raíz de soja presenta una mayor capacidad que la de altramuza para acumular Cu, pero una menor aptitud para translocar el metal a los órganos fotosintéticos, donde es más perjudicial por su efecto negativo sobre la fotosíntesis. Para alcanzar el 50% de la saturación en la acumulación de Cu en la parte aérea de altramuza y soja serían necesarios añadir al medio de cultivo alrededor 1,5 y 3,6 μM Cu, respectivamente.

Ambas leguminosas acumulan principalmente, el Cu en la raíz y este proceso se va intensificando a medida que aumenta la dosis en el medio externo. Con la dosis más alta utilizada (144 μM Cu), las raíces de altramuza acumulan 4258 mg kg^{-1} MS,

mientras en las de soja se alcanzan valores más elevados ($10661 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$). La capacidad de acumulación radicular de Cu se reduce considerablemente cuando las plantas están en simbiosis, ya que las raíces de altramuz y soja dan, después de haber estado sometidas durante 35 días a $192 \text{ }\mu\text{M}$ de Cu, concentraciones de 440 y $810 \text{ mg Cu kg}^{-1} \text{ MS}$. Luego ambas leguminosas, con independencia de que estén o no en simbiosis con *Rhizobium*, se comportan como especies exclusoras de Cu.

Las tasas de translocación de Cu varían con la especie vegetal, dosis de Cu y forma de cultivo (con o sin FBN). Los % de translocación de Cu en condiciones de normalidad oscilan entre $40 - 65\%$ tanto en las plantas cultivadas con o sin FBN. Estos valores se reducen enormemente con la dosis de Cu y también cuando el cultivo se realiza sin FBN. Además, hay que señalar que para dosis bajas de $\text{Cu} \leq 16 \text{ }\mu\text{M}$, la planta de altramuz da porcentajes de translocación algo mayores que la de soja, pero que la situación se invierte cuando aumenta la dosis de Cu.

En condiciones de normalidad de Cu, las hojas de las plantas altramuz y de soja cultivadas con o sin FBN, dan valores de concentración de Cu comprendidos entre 7 y $12 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$. Pero con la dosis más alta de Cu utilizada en los experimentos de hidroponía sin sustrato ($144 \text{ }\mu\text{M}$), las hojas de altramuz alcanzan los $171 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$ y las de soja $243 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$. Cuando el cultivo se realiza con FBN, las hojas de altramuz y soja tratadas con $192 \text{ }\mu\text{M}$ Cu acumulan 132 y $67 \text{ mg Cu kg}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente. De lo anterior se puede deducir, que los valores de concentración de Cu en las hojas de las especies vegetales estudiadas, se encuentran en el intervalo de toxicidad. En segundo lugar, que las tasas de acumulación foliar de Cu varían con la especie vegetal y con el sistema de cultivo. De tal forma que cuando las plantas son jóvenes y no están fijando N_2 , se intensifica la acumulación de Cu en las hojas, ya que la absorción neta de Cu es mayor y este hecho es más intenso en soja que en altramuz. Cuando las plantas están en simbiosis con *Rhizobium*, la absorción neta de Cu se reduce, pero también la capacidad de retención de las raíces, por lo que se transloca hacia el vástago de la planta, un porcentaje mayor de Cu, especialmente en altramuz, que cuando no están fijando N_2 .

Se han observado síntomas leves de toxicidad en las plantas de altramuz tratadas con 16 μM de Cu; manifestados por una ligera reducción del crecimiento y por la aparición de estrés oxidativo. Sin embargo, los síntomas de toxicidad por Cu aparecen de forma clara en altramuz y soja a partir de 16 μM . En ambas especies vegetales, la reducción del crecimiento es evidente desde la segunda semana de cultivo. El efecto inhibitor se acrecienta con la dosis externa, pero ha tenido mayor incidencia sobre el desarrollo de la cabellera radicular de altramuz. En soja afecta con más intensidad al crecimiento del vástago. Solamente la concentración de Cu en la parte aérea de altramuz y en la raíz de soja supera la estimada mediante el índice $\text{CTC}_{10\%}$, siendo los valores 18,2 y 101,2 mg Cu kg^{-1} MS para el vástago y las raíces de altramuz, respectivamente; mientras que en soja es 16,6 mg Cu kg^{-1} MS para la parte aérea y 95,0 mg Cu kg^{-1} MS para la subterránea. También las plantas en simbiosis sufren síntomas de toxicidad por Cu, pero son menos evidentes que en las cultivadas sin FBN. Los valores de $\text{CTC}_{10\%}$ obtenidos en estas condiciones, indican que para reducir un 10 % el crecimiento sería necesario que las plantas acumulasen una mayor concentración de Cu en los órganos.

Por otro lado, se han estudiado las alteraciones morfológicas, fisiológicas, estructurales y metabólicas provocadas por niveles elevados de Cu. El aporte de niveles de Cu comprendidos entre 3 y 16 μM , apenas causan alteraciones morfológicas, fisiológicas o metabólicas sobre las plantas de altramuz y soja. Sin embargo, el suministro de una dosis algo más alta (24 μM Cu) si las producen. Así en ambas especies vegetales, el descenso de la tasa de crecimiento relativo podría ser debido, entre otras cosas, a alteraciones fisiológicas más que a morfológicas, ya que se ha visto que el exceso de Cu reduce la tasa de asimilación neta, pero en cambio apenas afecta a la proporción de área foliar. Además, el estrés por Cu, reduce casi a la mitad la producción de clorofilas y carotenoides y a una quinta parte el índice de capacidad fotosintética en las hojas de soja. Lo anterior podría ser atribuido al efecto negativo que ejerce el Cu sobre la concentración foliar de Fe, la cual se ve fuertemente disminuida en las hojas de esta leguminosa, alcanzando el umbral de deficiencia. Esto no sucede en las hojas de altramuz, ya que esta especie absorbe

cinco veces más Fe y presenta el doble de acumulación efectiva en vástago que la planta de soja y, aunque también exista un antagonismo Cu-Fe, las hojas nunca se encontrarán en una situación de deficiencia. A nivel subcelular, un 50% del Fe presente en las hojas jóvenes y adultas de altramuza se encuentra localizado en los orgánulos, fundamentalmente en los cloroplastos (90% - adultas; 60% - jóvenes) y los porcentajes anteriores varían poco con la dosis de Cu. En las hojas de soja cultivadas con un nivel adecuado de Cu, sólo el 27% del Fe se encuentra en los orgánulos de las jóvenes y de ese porcentaje el 33% se localiza en los cloroplastos. Al aumentar la dosis de 1,6 a 24 μM de Cu, el Fe en los cloroplastos se reduce hasta el 19%.

A nivel morfológico y estructural, el incremento de la dosis de Cu de 1,6 a 24 μM parece que afecta con mayor intensidad a las hojas que a las raíces de ambos cultivos. Así en ambas leguminosas, el exceso de Cu reduce el área foliar, el número de hojas y la cantidad de peso seco localizado en las mismas; aunque también afecta, pero en menor cuantía, al radio y el área radicular. Cuando la dosis de Cu es $>$ a 24 μM , de las dos leguminosas estudiadas, es la parte aérea de la planta de altramuza la que presenta un efecto perjudicial más notable, de tal forma que se llega a observar prácticamente la muerte de las plantas al tratarlas con la dosis más alta (144 μM Cu). Lo anterior concuerda con los valores de EC_{50} encontrados, siendo menores en las plantas de altramuza que en las de soja. Lo que sugiere que dosis más bajas de Cu provocan la reducción de un 50% del crecimiento. En altramuza, los valores de EC_{50} encontrados en la parte aérea y subterránea son 38,2 y 32,1 μM , respectivamente, mientras que en soja son más altos (41,7 μM - vástago y 111,0 μM - raíz).

A nivel (ultra)estructural, se ha observado que el exceso de Cu causa en las hojas de ambas leguminosas una reducción del espesor, del tamaño de las células y de los espacios intercelulares del mesófilo, así como un aumento del número de gránulos de almidón en los cloroplastos, de la densidad electrónica del estroma y una pérdida de la alineación paralela de los tilacoides al eje principal del cloroplasto. El efecto negativo del Cu se intensificó en los cloroplastos de las hojas de soja con la

aparición de cuerpos lipídicos y plastoglóbulos, indicativos de la senescencia de estos orgánulos. Este proceso no se vio en los cloroplastos de las hojas de altramuza.

Por otro lado, para determinar los posibles mecanismos de bioacumulación de Cu implicados en estrategias de detoxificación frente al exceso de Cu, se ha estudiado la compartimentación de Cu a nivel celular y subcelular. En general, el metal se acumula mayoritariamente en la fracción soluble de las hojas y en el apoplasto de la raíz. No obstante, ante una situación de exceso, las paredes celulares de las raíces de soja tienen mayor capacidad que las de altramuza para secuestrar Cu, mostrando un gradiente decreciente desde el córtex externo al cilindro central. En las hojas, la acumulación de Cu en la fracción soluble se intensifica principalmente en las de altramuza y, especialmente, en el simplasto de las células del parénquima lagunar.

El estrés por Cu también ha provocado desequilibrios en la nutrición mineral de altramuza y soja. Si bien su incidencia va a depender de la especie vegetal, de la dosis de Cu y el tiempo de exposición, así como del sistema de cultivo. En general, el aporte de 24 μM Cu a las plantas cultivadas sin FBN, reduce la concentración de los macronutrientes (N, P, K, Ca y Mg) y de algunos micronutrientes (Fe y Ni) en la planta de altramuza, siendo la raíz el órgano más afectado. En cambio en soja, el exceso de Cu aumenta la concentración de los micronutrientes analizados en la parte aérea y raíz, salvo la de Fe y Ni en las hojas y no altera la de macronutrientes. A nivel subcelular, se ha detectado un aumento de la concentración de Mn, Zn, K, Ca y Mg en las distintas fracciones subcelulares de las células de las hojas y raíces de soja cultivadas con exceso de Cu (24 μM), frente a los descensos de Fe, Mn, Zn, K y Ca observados en los orgánulos de las hojas y en la fracción soluble de la raíz. Pero cuando el aporte de Cu es $>$ a 24 μM , se reduce enormemente la absorción y acumulación de los nutrientes en los distintos órganos de las especies vegetales estudiadas. En condiciones de fijación de N_2 , dosis \geq 48 μM Cu reducen la concentración de Fe, Zn y Ni en hojas, tallos y raíces de altramuza y soja, en cambio no afectan a la de N. En nódulos, el

exceso de Cu promueve la acumulación de Fe, Mn, Zn y Ni en los de soja, pero reduce la Fe y Zn en los de altramuiz.

A nivel de absorción, la presencia de niveles elevados de Zn y Cd reduce la velocidad de absorción de Cu por las raíces de altramuiz, mientras que en soja la exalta. Si bien para los metales, se observa un mecanismo activo de absorción de Cu para todo el intervalo de Cu aplicado a las raíces de altramuiz. La presencia de niveles elevados de Mn en el medio estimula la absorción de Cu en ambas leguminosas. En cualquier caso, las raíces de soja absorben una mayor cantidad de Cu que las de altramuiz. En altramuiz, la absorción de Cu, en presencia de Mn, es activa a bajas concentraciones de Cu y pasiva a niveles elevados del metal. En soja, la absorción de Cu en presencia de Zn, Mn y Cd es bifásica, existiendo un transporte activo a bajas concentraciones de Cu y pasivo a dosis elevadas del metal.

El aporte de niveles elevados de Cu al medio de cultivo afecta al proceso de infección en altramuiz y soja. Asimismo, promueve alteraciones ultraestructurales en los nódulos de ambas leguminosas, ya que se observa un aumento en el contenido de glicoproteínas, la oclusión de los espacios intercelulares en la corteza media, la ruptura o degradación de la membrana peribacteroidal en altramuiz y la bacteroidal en soja. Además en esta última especie se ha producido un aumento de la vacuolización y la aparición de precipitados en el jugo vacuolar. También se han observado diferencias inter-específicas en la localización celular y subcelular de Cu en los nódulos tratados con la dosis más alta de Cu (192 μM). En los de altramuiz, el Cu se deposita fundamentalmente en la corteza interna y zona infectada, mientras que en los nódulos de soja se ve un gradiente decreciente de Cu en las paredes celulares de los tejidos nodulares. A nivel subcelular, los nódulos de altramuiz acumulan una mayor proporción de Cu en la pared celular, mientras que los nódulos de soja lo depositan en las vacuolas.

Al comparar el efecto que produce el exceso de Cu sobre el funcionamiento de plantas noduladas y sin nodular, se ha observado que bajo condiciones de FBN parece que aumenta la tolerancia al metal en ambas especies vegetales. Así en las plantas

noduladas, el exceso de Cu reduce, en menor medida, el crecimiento del vástago que en las no noduladas, llegando incluso a aumentar la biomasa de la raíz. Conviene destacar que aunque la tasa de absorción neta de Cu se reduce en ambas leguminosas, aumenta considerablemente la translocación de Cu a la parte aérea. Además en las plantas cultivadas con FBN, las actividades de las enzimas relacionadas con el metabolismo del C y del N casi no se alteran y hay menos estrés oxidativo. Lo anterior está directamente relacionado con los valores de los parámetros toxicológicos obtenidos, los cuales son más altos con FBN que sin fijación. Entre las estrategias que podrían estar implicadas en la resistencia al estrés por Cu en las plantas sometidas a fijación de N₂ se encuentran la reducción de la absorción de Cu, el aumento del contenido de proteínas, así como la escasa variación en las actividades de las enzimas relacionadas con el metabolismo del N y C.

El exceso de Cu también ha afectado a la funcionalidad de los nódulos de ambas leguminosas, y por consiguiente, al proceso de fijación de N₂. Además en altramuz, tanto el nódulo como la planta huésped se muestran sensibles al exceso de Cu, mientras que en soja es el vástago la parte más afectada por el metal. Por tanto, parece que de las dos leguminosas estudiadas, es la planta de soja la que se muestra más tolerante al exceso de Cu, debido a mayor acumulación de Cu en los órganos subterráneos de la planta, al menor transporte del metal a la parte aérea, unido al aumento de la concentración de micronutrientes en el nódulo y la mayor localización de Cu en los tejidos más externos de este órgano, podrían actuar como mecanismos de defensa frente al estrés por Cu.

Finalmente, este estudio deberá ser completado con ensayos en suelos con niveles elevados de Cu de forma individual o en combinaciones binarias o terciarias de los contaminantes mayoritarios seleccionados de diversos emplazamientos y con las especies vegetales más adecuadas en cada caso. El desarrollo de estas tareas será abordada en mi etapa postdoctoral dentro del marco de los proyectos I+D+i que desarrolla actualmente el grupo de investigación de “Metales Pesados en Plantas Superiores. Fitorremediación” (UAM C-129).



Conclusiones

1. En ensayos a corto plazo, la planta de altramu  presenta una mayor velocidad de absorción de Cu que la de soja, pero una menor afinidad por el metal. A medio o largo plazo, la planta de soja absorbe y acumula una mayor cantidad de Cu que la de altramu .
2. Altramu  y soja acumulan el Cu principalmente en raíz. A nivel celular y en condiciones de estrés por Cu, ambas leguminosas localizan principalmente el metal en la epidermis inferior de las hojas y en el córtex externo de la raíz. A nivel subcelular, lo almacenan en la fracción soluble de las células foliares y en la pared de las células radiculares.
3. Sin fijación biológica de N₂, el exceso de Cu reduce con mayor intensidad el crecimiento de la raíz en altramu  y el de la parte aérea de soja, mientras que con fijación de N₂ es el vástago la parte de la planta que se ve más afectada.
4. Desde un punto de vista fisiológico, el exceso de Cu causa en altramu  desequilibrios importantes en la nutrición mineral, mientras que en soja altera fundamentalmente a la actividad fotosintética.
5. A nivel morfológico y estructural, el exceso de Cu afecta con mayor intensidad a las hojas que a las raíces en ambos cultivos, siendo el altramu  el que presenta unas modificaciones más acusadas.
6. El estrés por Cu provoca alteraciones (ultra)estructurales en el nódulo y en el aparato fotosintético de altramu  y soja. El nódulo, reduce el tamaño de las células del córtex, aumenta el contenido de glicoproteínas y la oclusión de los espacios intercelulares y causa la degradación de la membrana bacteroidal y peribacteroidal de los simbiosomas. En el cloroplasto, aparece una desorganización del sistema lamelar con pérdida de la orientación paralela al eje principal del cloroplasto. También se observa un incremento de cuerpos lípidos y de plastoglobulos en los de soja.

7. Con el exceso de Cu el contenido de proteínas y la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo del N y C se reducen en las hojas y en las raíces de plantas no noduladas de altramuza, en cambio apenas se alteran en las de soja. Sin embargo, aumentan en los órganos de las leguminosas cultivadas en simbiosis con *Rhizobium*.

8. El estrés por Cu afecta al proceso de infección y al metabolismo nodular, reduciendo principalmente la actividad de las enzimas implicadas en la asimilación del N en los nódulos de altramuza y la del C en los de soja.

9. Ambos cultivos se muestran muy sensibles al exceso de Cu. Si bien, la soja se comporta como una especie vegetal más resistente que la de altramuza, tanto si está cultivada con o sin fijación biológica de N₂.

10. Las estrategias i/o mecanismos de defensa que podrían estar involucrados serían:
i) una mayor acumulación de Cu en los órganos subterráneos de las plantas; ii) una intensificación de la fijación de Cu a la pared celular a costa del soluble y del contenido en los orgánulos y iii) una mayor localización del Cu en la corteza externa del nódulo.

11. Frente al estrés por Cu, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa parece ejercer un efecto protector sobre las plantas huésped, ya que reduce:

- i. la tasa de absorción de Cu
- ii. la inhibición del crecimiento
- iii. y el estrés oxidativo

Sin embargo, no es el único factor implicado en ello, también podría estar involucrado el sistema de cultivo empleado.

12. El umbral de toxicidad de Cu en altramuza y soja se encuentra comprendido en el intervalo 16-24 μM en las plantas cultivadas sin fijación biológica de N₂ y entre 48-78,6 μM en las crecidas en simbiosis.



Bibliografía

- Abedin MJ, Feldmann J, Meharg AA. (2002). Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiol.* 128: 1120:1128.
- Abo-Kassen E, El-Din-Sharaf A, Rozema J, Foda EA. (1991). Synergistic effects of cadmium and NaCl on the growth, photosynthesis and ion content in wheat plants. *Biol. Plant.* 37: 241-249.
- Agroanálisis. (1995). Informe Económico. N° 125.
- Alaoui-Sossé B, Genet P, Vinit-Dunand F, Toussaint ML, Epron D, Badot PM. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Sci.* 166: 1213-1218.
- Ali NA, Ater M, Sunahara GI, Robidoux PY. (2004). Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils. *Ecotoxi. Environ. Saf.* 57: 363-374.
- Ali NA, Bernal MP, Ater M. (2002). Tolerance and bioacumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant Soil* 239:103-111.
- Alloway JB. (1995). Heavy Metals in Soils, 2nd Ed. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Alva AK, Graham JH, Tucker DPH. (1993). Role of calcium in amelioration of copper phytotoxicity for citrus. *Soil Science* 155: 211-218.
- An YJ, Kim YM, Kwon TI, Jeong SW. (2004). Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Sci. Total Environ.* 326: 85-93.
- An YJ. (2004). Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environ. Pollut.* 127: 21-26.
- An YJ. (2006). Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere* 62: 1359-1365.
- Andrade LR, Farina M, Amado Filho GM. (2004). Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) in vitro. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58: 117-125.
- Angelova V, Ivanova R, Ivanov K. (2003). Accumulations of heavy metals in leguminous crops (bean, soybean, peas, lentils and gram). *J. Environ. Protec. Ecol.* 4: 784-795.
- Antunes PMC, Hale BA. (2006). The effect of metal diffusion and supply limitations on conditional stability constants determined for durum wheat roots. *Plant Soil* 284: 229-241.
- Antúnez de Mayolo SE. (1980). Tarwi in ancient Peru. *Proceedings Firts International Lupin Workshop*. Lima. Perú, pp. 1-8.
- Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C, Becana M. (2008). Fijación biológica de nitrógeno. En: Azcón-Bieto J, Talon M (Eds). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill. Madrid, pp. 305-322.
- Arrese-Igor C, González EM, Gordon AJ, Minchin FR, Gálvez L, Royuela M, Cabrerizo PM, Aparicio-Tejo PM. (1999). Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. *Symbiosis* 27: 189-212.
- Arru L, Rognoni S, Baroncini M, Bonatti PM, Perata P. (2004). Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper-rich solution. *Euphytica* 140: 33-38.
- Aubert H, Pinta M. (1977). Trace Elements in Soils. *Development in Soil Science* 7. Elsevier Publ., Amsterdam, p. 395.
- Babalakova N, Traykova D. (2001). Copper induced cupric and ferric-chelate reduction by intact barley roots. *Bulg. J. Plant Physiol.* 27(3-4): 93-103.
- Baca BE, Soto L, Pardo MPA. (2000). Fijación Biológica de Nitrógeno. En: *Elementos: Ciencia y Cultura*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México vol. 7, N° 38, pp. 43-49.

- Baker AJM, McGrath SP, Reeves RD, Smith JAC. (1998). Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N, Bañuelos GS (Eds). Phytoremediation. Ann Arbor Press, Ann Arbor, MI.
- Baker DE, Senft JP. (1995). Copper. In: Alloway JB (Ed). Heavy Metals in Soils, 2nd Ed. Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp. 178-205.
- Balestrasse KB, Benavides MP, Gallego S, Tomaro ML. (2003). Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Funct. Plant Biol.* 30: 57-64.
- Balestrasse KB, Gardey L, Gallego SM, Tomaro ML (2001) Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:497-504.
- Banat KM, Howari FM, Abdullah MB. (2005). Mineralogy and hydrochemical characteristics of the late marshes and swamps of Hor Al-Hammar, southern Iraq. *J. Arid Environ.* 65: 400-19.
- Barceló J, Poschenrieder C. (1999). Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J (eds). Heavy Metal Stress in Plants. Springer, Heidelberg, pp. 183-205.
- Barceló J, Vazquez MD, Poschenrieder C. (1988). Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytol.* 108: 37-49.
- Barón M, Arellano JB, López-Gorgé J. (1995). Copper and photosystem II: a controversial relationship. *Physiol. Plant* 94: 174-180.
- Becana M, Rodríguez-Barrueco C. (1989). Protective mechanisms of nitrogenase against oxygen excess and partially-reduced oxygen intermediates. *Physiol. Plant.* 75: 429-438.
- Bell PF, Chaney RL, Angle JS. (1991). Determination of copper activity required by maize using chelator-buffered nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 55: 7824-7828.
- Bender, FE, Douglass LW, Framer A. (1989). Statistical Methods for Food and Agriculture. Food Products Press. NY
- Bernal M, Cases R, Picores R, Yruela I. (2007). Foliar and root Cu supply affect differently Fe- and Zn-uptake and photosynthetic activity in soybean plants. *Environ. Exp. Bot.* 60:145-50.
- Bernal M. (2006). Mecanismo de tolerancia al exceso de cobre en suspensiones celulares de soja. Caracterización del transportador de cobre HMA8. Tesis Doctoral. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Zaragoza.
- Bienfait HF. (1988). Proteins under the control of the gene for Fe efficiency in tomato. *Plant Physiol.* 88: 785-787.
- Bogacz W, Chamcham S, Roszyk E. (1991). Accumulation of heavy metals in the soil and plants of one the quarters of Wrocław. *Pol. S. Soil Sci.* XXI, 31-34.
- Borghi M, Tognetti R, Monteforti G, Sebastiani L. (2007). Responses of *Populus × euramericana* (*P. deltoides* × *P. nigra*) clone Adda to increasing copper concentrations. *Environ. Exp. Bot.* 61, 66-73.
- Borghi M, Tognetti R, Monteforti G, Sebastiani L. (2008). Responses of two poplar species (*Populus alba* and *Populus × canadensis*) to high copper concentrations. *Environ. Exp. Bot.* 62: 290-299.
- Bowen GD, Rovira AD (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66, 1-102.
- Bowen JE. (1987). Physiology and genotypic differences in zinc and copper uptake in rice and tomato. *Plant Soil* 99: 115-125.
- Bradford MM. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Brady DJ, Hecht-Buchholz CH, Asher CJ, Edwards DG. (1990). Effects of low activities of aluminium on soybean (*Glycine max*). I. En: van Beusichem ML (Ed.), Early growth and nodulation. Plant Nutr. Physiol. Applications. Kluwer Academic Publishers, Haren, Netherlands, pp. 329-334.
- Bravin MN, Merrer BL, Denaix L, Schneider A, Hinsinger P. (2010). Copper uptake kinetics in hydroponically-grown durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) as compared with soil's ability to supply copper. Plant Soil 331: 91-104.
- Brewin NJ. (2004). Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium* legume symbiosis. Crit. Rev. Plant Sci. 23: 293-316.
- Brooks RR. (1998). Phytochemistry of hyperaccumulators. En: Brooks, R.R. (Ed.), Plant that Hyperaccumulate Heavy Metals. CAB International, Wallingford, pp. 15-53.
- Broos K, Mertens J, Smolders E (2005). Toxicity of heavy metals in soil assessed with various soil microbial and plant growth assays: A comparative study. Environ. Toxicol. Chem. 24:634-640.
- Brun LA, Maillet J, Hinsinger P, Pepin M. (2001) Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. Environ. Pollut. 111: 293-302.
- Bruus Pedersen M, Kjaer C, Elmegaard. (2000). Toxicity and bioaccumulation of copper to black bindweed (*Fallopia convolvulus*) in relation to bioavailability and the age of soil contamination. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 39: 431-439.
- Burkhead JL, Gogolin Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M. (2009). Copper homeostasis. New Phytol. 182:799-816.
- Burzynski M, Migocka M, Klobus G. (2005). Cu and Cd transport in cucumber (*Cucumis sativus* L.) root plasma membranes. Plant Sci. 168: 1609-1614.
- Cao H, Wang J, Zhang X. (2007a). Ecotoxicity of cadmium to maize and soybean seedling in black soil. Chin. Geograph. Sci. 17: 270-274.
- Cao Q, Hu QH, Khan S, Wang ZJ, Lin AJ, Du X, Zhu YG. (2007b). Wheat phytotoxicity from arsenic and cadmium separately and together in solution culture and in a calcareous soil. J. Hazard. Mater. 148: 377-382.
- Cao T, An L, Wang M, Lou Y, Yu Y, Wu J, Zhu Z, Qing Y, Glime J. (2008). Spatial and temporal changes of heavy metal concentrations in mosses and its indication to the environments in the past 40 years in the city of Shanghai, China. Atmos. Environ. 42: 5390-5402.
- Carpena R, Esteban E, Lucena JJ, Peñalosa J, Vázquez S, Zornoza P, Gárate A. (2006). Simbiosis y fitorrecuperación de suelos. En: Bedmar EJ, Gozález C, Lluch C, Rodelas B (Eds). Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Granada, España, pp. 254-268.
- Carpena RO, Vázquez S, Esteban E, Fernández-Pascual M, de Felipe MR, Zornoza P. (2003). Cadmium-stress in white lupin: effects on nodule structure and functioning. Plant Physiol. Biochem. 40: 1003-1009.
- Cataldo DA, Garland TR, Wildung RE. (1983). Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. Plant Physiol. 73: 844-848.
- Cataldo DA, Wildung RE. (1978). Soil and plants factors influencing the accumulation of heavy metals by plants. Environ. Health Persp. 27: 149-159.
- Catálogo común de variedades de especies de plantas agrícolas. 28ª edición integral. Diario Oficial de la Unión Europea (2009/C 302 A/01).
- Cathala N, Salsac L. (1975). Absorption of copper by roots of corn (*Zea mays*) and sunflower (*Helianthus annuus*). Plant Soil 42: 65-83.
- Chatterjee J, Chatterjee C. (2000). Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. Environ. Pollut. 109, 69-74.

- Chen T, Yan X, Liao X, Xiao X, Huang Z, Xie H, Zhai L. (2005). Subcellular distribution and compartmentalization of arsenic in *Pteris vittata* L. Chin. Sci. Bull. 50: 2843-2849.
- Chen YX, He YF, Yang Y, Yu YL, Zheng SJ, Tian GM, Luo YM, Wong MH. (2003). Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils. Chemosphere 50: 781-787.
- Chichiricco G, D'Alessandro A, Avigliano L. (1989). Immunohistochemical localisation of ascorbate oxidase in *Cucurbita pepo* medullosa. Plant Sci. 64: 61-66.
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schroeder JI. (1998). The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 12043-12048.
- Clemens S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212: 475-486.
- Cobbett C, Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Ann. Rev. Plant Biol. 53: 159-182.
- Cocoza C, Minnocci A, Tognetti R, Lori V, Zacchini M, Scarascia Mugnozza G. (2008). Distribution and concentration of cadmium in root tissue of *Populus alba* determined by scanning electron microscopy and energy-dispersive x-ray microanalysis. iForest 1:96-103.
- Cohen CK, Fox TC, Garvin DF. (1998). The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy metal transport in plants. Plant Physiol. 116:1063-1072.
- Cohen CK, Norwell WA, Kochian LV. (1997). Induction of root cell plasma membrane ferric reductase. Plant Physiol. 114: 1061-1069.
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defense. Trends Plant Sci. 11: 80-88.
- Cook CM, Vardaka E, Lanaras T. (1997). Concentrations of Cu, growth, and chlorophyll content of field-cultivated wheat growing in naturally enriched Cu soil. B. Environ. Contam. Tox. 58: 248-53.
- Costa C, Morel JL. (1993). Cadmium uptake by *Lupinus albus* (L.): cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance. J. Plant Nutr. 16: 1921-1929.
- Cox WJ. (1978). Potassium deficiency in lupins. J. Agric. Western Australia 19: 24-31.
- Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. (2000). Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. Physiol. Plant. 110: 512-517.
- Dancis A, Haile D, Yuan DS, Klausner RD. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper and physiologic role in copper uptake. J. Biol. Chem. 269: 25660-25667.
- Dandan L, Dongmei Z, Peng W, Nanyan W, Xiangdong Z. (2011). Subcellular Cd distribution and its correlation with antioxidant enzymatic activities in wheat (*Triticum aestivum*) roots. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74: 874-881.
- Das P, Samantaray S, Rout GR. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. Environ. Pollut. 98: 29-36.
- de Felipe MR. (2004). Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del medio ambiente y la salud. An. R. Acad. Nac. Farm. 70: 743-776.
- de Felipe MR. (2009). Biotecnologías limpias en agricultura: Fijación Biológica de Nitrógeno. Estructura - función de la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosas. Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, pp. 103-151.
- De Groot C. (2002). Phosphorous and nitrogen nutrition in tomato: A physiological analysis of plant growth. Ph-D Thesis. Utrecht University. Utrecht.

- de Lorenzo C, Lucas MM, Vivo A, de Felipe MR. (1990). Effect of nitrate on peroxisome ultrastructure and catalase activity in lupin nodules (*Lupinus albus* L. cv Multolupa). J. Exp. Bot. 41: 1573-1578.
- de Lorenzo C. (1992). Efecto del nitrato sobre la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno y sobre el metabolismo de especies tóxicas de oxígeno en nódulos de lupino. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
- de María N, Becerril JM, García-Plazaola JI, Hernández A, de Felipe MR, Fernández-Pascual M. (2006). New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: The role of shikimate accumulation. J. Agri. Food Chem. 54: 2621-2628.
- de María N, de Felipe MR, Fernández-Pascual M. (2005). Alterations induced by glyphosate on lupin photosynthetic apparatus and nodule ultrastructure and some oxygen diffusion related proteins. Plant Physiol. Biochem. 43: 985-996.
- de María N. (2004). Efecto del glifosato sobre la simbiosis de *Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*). Tesis Doctoral. Departamento de Biología Vegetal I. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- De Pinheiro Henriques AR, Marcelis LF. (2000). Regulation of growth at steady-state nitrogen nutrition in lettuce (*Lactuca sativa* L.): interactive effects of nitrogen and irradiance. Ann. Bot. 86: 1073-1080.
- Demirevska-Kepova K, Simova-Stoilova L, Stoyanova Z, Hölzer R, Feller U. (2004). Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. Environ. Exp. Bot. 52: 253-266.
- Di Baccio D, Tognetti R, Minnocchia A, Sebastiani L. (2009). Responses of the *Populus × euramericana* clone I-214 to excess zinc: Carbon assimilation, structural modifications, metal distribution and cellular localization. Environ. Exp. Bot. 67: 153-163.
- Díaz J, Bernal A, Pomar F, Merino F. (2001). Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. Plant Sci. 161: 179-188.
- Didonato RJ, Roberts LA, Sanderson T, Eisley RB, Walker EL. (2004). Arabidopsis yellow stripe-like2 (YSL2): a metal regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. Plant J. 39: 403-414.
- Dixon RA, Paiva NL. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 7: 1085-1097.
- Dong J, Kim ST, Lord EM. (2005). Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis. Plant Physiol. 138: 778-789.
- Drazkiewicz M, Skórzynska E, Krupa Z. (2004). Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. Biometals 17: 379-387.
- Drazkiewicz M, Skórzynska-Polit E, Krupa Z. (2003). Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). Plant Sci. 164: 195-202.
- Drazkiewicz M, Skórzynska-Polit E, Krupa Z. (2004). Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. Biometals 17: 379-387.
- Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE. (2007). The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. Plant Physiol. 144: 197-205.
- Egli DB, Bruening WP. (2000). Potential of early-maturing soybean cultivars in late plantings. Agron. J. 92: 532-537.
- El-Gramry AM, Subhani A, Moh'd W, Huang C, Xie Z. (2000). Effects of copper toxicity on soil microbial biomass. Pakistan J. Biol. Sci. 3: 907-910.

- Esteban E, Carpena RO, Meharg AA. (2003). High-affinity phosphate/arsenate transport in white lupin (*Lupinus albus*) is relatively insensitive to phosphate status. *New Phytol.* 158: 165-173.
- Esteban E, Moreno E, Peñalosa JM, Cabrero JI, Millan R, Zornoza P. (2008). Short and long-term uptake of Hg in white lupin plants: Kinetics and stress indicators. *Environ. Exp. Bot.* 62: 316-322.
- Evans GC. (1972). *The Quantitative Analysis of Plant Growth*. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Fernandes JC, Henriques FS. (1991). Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* 57: 246-273.
- Fernández MT, Mira ML, Florencio MH, Jennings KR. (2002). Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J. Inor. Biochem.* 92: 105-111.
- Fernández-Pascual M, de Lorenzo C, de Felipe MR, Rajalakshmi S, Gordon A, Thomas J, Minchin FR (1996). Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa, *J. Exp. Bot.* 47 (1996) 1709-1716.
- Fernández-Pascual M, de Lorenzo C, Pozuelo JM, de Felipe MR. (1992). Alterations induced by four herbicides on lupin nodule cortex structure, protein metabolism and some senescence-related enzymes. *J. Plant Physiol.* 140: 385-390.
- Fernández-Pascual M, Pozuelo JM, Serra MT, de Felipe MR. (1988). Effects of cyanazine and linuron on chloroplast development, nodule activity and protein metabolism in *Lupinus albus* L. *J. Plant Physiol.* 133: 288-294.
- Fernández-Pascual M, Pueyo JJ, de Felipe MR, Golvano MP, Lucas MM. (2007). Singular features of the *Bradyrhizobium-Lupinus* symbiosis. *Dynamic Soil, Dynamic Plant* 1: 1-16.
- Ferri A, Lluch C, Ocana A. (2000). Effect of salt stress on carbon metabolism and bacteroid respiration in root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biol.* 2: 396-402.
- Fox TC, Gueriot ML. (1998). Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 49: 669-696.
- Foy CD, Chaney RL, White MC. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Phys.* 29: 511-566.
- Franssen HJ, Vijn I, Yang WC, Bisseling T. (1992). Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* 19:89-107.
- Frérot H, Lefebvre C, Gruber W, Collin C, Dos Santos A, Escarre J. (2006). Specific interactions between local metalicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant and Soil* 282: 53–65.
- Frey B, Keller C, Zierold K, Schulz R. (2000). Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Cell Environ.* 23: 675-687.
- Gädick P. (1996). Estudio de aves reproductoras alimentadas en base a lupinos con distintas cantidades de alcaloides. Tesis Doctoral. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia-Chile.
- Gage DJ, Margolin W. (2000). Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr Opin. Microbiol.* 3: 613-617.
- Gálvez L, González EM, Arrese-Igor C. (2005). Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *J. Exp. Bot.* 56: 2551–2561.
- García I, Dorronsoro C. (2001). Contaminación por metales pesados. Universidad de Granada. <http://edafología.ugr.es/>, España.

- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters* 581: 2204-14.
- Georgiev G, Atanasov B, Kalmuckov K, Alexandrova E, Uzunova A. (1996). Assimilates and nutrients partitioning and efficiency of nitrogen fixation of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) grown on the excess of Cu in soil. *Bulg. J. Plant Physiol.* 22: 40-55.
- Gepts P, Beavis WP, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the crops legume advances through genomics conference. *Plant Physiol.* 137: 1228-1235.
- Giller K.E, Witter E, McGrath SP (2009). Heavy metals and soil microbes. *Soil Bio. Biochem.* 41: 2031–2037.
- Gogorcena Y, Gordon AJ, Escuredo PR, Minchin FR, Witty J, Moran JF, Becana M. (1997). N₂ fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plant Physiol.* 113: 1193-1201.
- Gonnelli C, Galardi F, Gabbrielli R. (2001). Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. *Physiol. Plant* 113: 507-514.
- González EM, Aparicio-Tejo PM, Gordon AJ, Minchin FR, Royuela M, Arrese-Igor C. (1998). Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *J. Exp. Bot.* 49: 1705-1714.
- González EM, Gálvez L, Marino D, Ladrera R, Larrainzar E, Arrese-Igor C. (2006). Metabolismo carbonado y nitrogenado en nódulos. *En: Bedmar EJ, González J, Lluch C, Rodelas B (Eds). Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Granada, España, pp. 194-206.*
- González EM, Gordon AJ, James CL, Arrese-Igor C. (1995). The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *J. Exp. Bot.* 46: 1515–1523.
- González-Sama A, Coba de la Peña T, Redondo Vela F, de María N, Guasch L, Fedorova E, de Lorenzo C, Hernández-Jiménez MJ, Pozuelo JM, Golvano MP, de Felipe MR, Pueyo JJ, Fernández-Pascual M, Lucas MM. (2006). Características especiales de la simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium* sp (*Lupinus*). *En: Bedmar EJ, González C, Lluch C, Rodelas B (Eds). Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. Granada, pp. 182-193.*
- González-Sama A. (2003). Procesos iniciales del establecimiento de la simbiosis *Lupinus albus-Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.
- Gordon AJ, Kessler W, Minchin FR. (1990). Defoliation-induced stress in nodules of white clover. I. Changes in physiological parameters and protein synthesis. *J. Exp. Bot.* 231: 1245-1253.
- Gordon AJ, Kessler W. (1990). Defoliation-induced stress in nodules of white clover. II. Immunological and enzymatic measurements of key proteins. *J. Exp. Bot.* 41: 1255-1262.
- Gordon AJ, Minchin FR, Skot L, James CL. (1997). Stress-induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiol.* 114: 937-946.
- Gouia H, Suzuki A, Brulfert J, Ghorbal MH. (2003). Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. *J. Plant Physiol.* 160: 367–376.
- Graham RD. (1981). Absorption of copper by plant roots. *En: Loneragan JF, Robson AD, Graham RD (Eds). Copper in Soil and Plants, Academic Press, Sydney, Australia, pp. 141-163.*
- Greger M, Brammer E, Lindberg S, Larsson G, Idestam-Almqvist J. (1991). Uptake and physiological effects of cadmium in sugar beet (*Beta vulgaris*) related to mineral provision. *J. Exp. Bot.* 42: 729-737.
- Greger M, Wang Y, Neuschütz C. (2005). Absence of Hg transpiration by shoot after Hg uptake by roots of six terrestrial plant species. *Environ. Pollut.* 134: 201-208.

- Greger M. (2004). Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. En: Prasad MNV (Ed.). Heavy Metals Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems. 2nd Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-27.
- Groat CR, Vane CP. (1981). Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa. *Plant Physiol.* 67: 1198-1203.
- Guasch LM, de Felipe MR, Fernández-Pascual M. (2001). Effects of different O₂ concentrations on nitrogenase activity, respiration, and O₂ diffusion resistance in *Lupinus albus* L. cv. Multolupa nodules. *J. Plant Physiol.* 158: 1395-1402.
- Guerinot ML. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 190-198.
- Guo WJ, Bundithya W, Goldsbrough P. (2003). Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol.* 159: 369-381.
- Guo WJ, Meetam M, Goldsbrough P. (2008). Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol.* 146: 1697-1706.
- Gupta M, Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H (1999). Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycles and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 106: 262-267.
- Gupta UC, Gupta SC. (1998). Trace element toxicity relationships to crop production and livestock and human health: Implications for management. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 29: 1491-522.
- Gutiérrez Mañero FJ, Lucas García JA, Probanza Lobo A, Ramos Solano B. (2006). Interacción planta-microorganismos en un ecosistema denominado rizosfera. En: Bedmar EJ, González C, Lluch C, Rodelas B (Eds). Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. Granada, pp. 182-193.
- Hagemeyer J. (2004). Ecophysiology of plant growth under heavy metals stress. En: Prasad MNV (Ed.). Heavy Metals Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems. 2nd Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 201-222.
- Hajduch M, Rakwall R, Agrawal GK, Yonekura M, Pretova A. (2001). High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress related proteins. *Electrophoresis* 22: 2824-2831.
- Hall JL. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53: 1-11.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press (Eds), Oxford, U.K.
- Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT. (2000). Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 25: 29-32.
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV. (1998). Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol.* 116: 1413-1420.
- Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Meharg AA. (2011). Copper- and arsenate- induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant Cell Environ.* 24: 713-722.
- Haydon MJ, Cobbett CS. (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 174: 499-506.
- He JY, Zhu Ch, Ren YF, Yan YP, Chen Ch, Jiang DA, Sun ZX. (2008). Uptake, subcellular distribution, and chemical forms of cadmium in wild-type and mutant rice. *Soil Sci. Soc. China* 18: 371-377.

- Herbik A, Bölling C, Buckhout TJ. (2002). The involvement of a multicopper oxidase in iron uptake by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 130: 2039-2048.
- Hernández LE, Gárate A, Carpena-Ruiz RO. (1995). Effect of cadmium on nitrogen fixing pea plants grown in perlite and vermiculite. *J. Plant Nutr.* 18: 287-303.
- Hernández LE, Lozano-Rodríguez E, Garate A, Carpena-Ruiz R. (1998). Influence of cadmium on the uptake, tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in pea seedlings. *Plant Sci.* 132: 139-151.
- Hernández LE, Lozano-Rodríguez E, Gárate A, Carpena-Ruiz R. (1998). Influence of cadmium on the uptake, tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in pea seedlings. *Plant Sci.* 132: 139-151.
- Hernández-Jiménez MJ, Lucas MM, de Felipe MR. (2002). Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 645-657.
- Hess FD. (1980). Influence of specimen topography on microanalysis. En: Hayat MA, (Ed.). *X-Ray Microanalysis in Biology*. Macmillan publishers LTD, London, pp. 241-261.
- Hirsch AM. (1992). Development biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122: 211-237.
- Hunt R, Causton DR, Shipley B, Askew AP. (2002). A modern tool for classical growth analysis. *Ann. Bot.* 90: 485-488.
- Hunt R. (1982). *Plant growth curves. The functional approach in plant growth analyses*. Eduard Arnold Publishers Ltd. London.
- Iwasaki K, Sakurai K, Takahashi E. (1990). Copper binding by the root cell walls of Italian ryegrass and red clover. *Soil Sci. Plant Nutr.* 36: 431-439.
- Jackson PJ, Unkefer PJ, Delhaize E, Robinson NJ. (1990). Mechanisms of trace metal tolerance in plants. En: Katterman F (Ed.). *Environmental Injury to Plants*. Academic Press, San Diego, pp. 231-58.
- Jiang W, Liu D, Liu X (2001). Effect of copper on root growth, cell division and nucleolus of *Zea mays*. *Biol. Plant.* 44: 105-109.
- Jocelyn PC. (1987). Sulfur and sulfur amino acids En: *Methods in Enzymology*. Academic Press, eds. Jakoby W.B. and Griffith O.W., 143: 44-50, London.
- Jonak C, Nakagami H, Hirt H. (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol.* 136: 3276-3283.
- Jordá L. (2008). *La minería de los metales en la provincia de Madrid: Patrimonio minero y puesta en valor del espacio subterráneo*. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas. Universidad Politécnica de Madrid.
- Jung C, Maeder V, Funk F, Frey B, Sticher H, Frossard E. (2003). Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil* 252: 301-12.
- Kabata-Pendias A, Pendias H. (2000). *Trace Elements in Soil and Plants*. 3th Ed. CRC Press, Boca Raton.
- Kalyanaraman SB, Sivagurunathan P. (1993). Effect of cadmium, copper, and zinc on the growth of blackgram. *J. Plant Nutr.* 16: 2029-2042.
- Kasim W A. (2005). The correlation between physiological and structural alterations induced by copper and cadmium stress in broad beans (*Vicia faba* L.). *Egypt. J. Biol.* 7: 20-32.
- Kasim WA. (2006). Changes Induced by copper and cadmium stress in the anatomy and grain yield of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Int. J. Agri. Biol.* 8: 123-128.
- Ke W, Xiong Z, Xie M, Luo Q. (2007). Accumulation, subcellular localization and ecophysiological responses to copper stress in two *Daucus carota* L. populations. *Plant Soil* 292: 291-304.

- Ke W, Xiong Z-T, Chen S, Chen J. (2007). Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex japonicus* populations from a copper mine and an uncontaminated field sites. *Environ. Exp. Bot.* 59: 59-67.
- Kiers TE, Rousseau AR, West AS, Denison FR. (2003). Host sanctions and the legume-*Rhizobium* mutualism. *Nature* 425: 78-81.
- Kijne JW, Díaz CL, de Pater BS, Smit G, Bakhuizen R, Lugtenberg BJJ. (1990). Surface interactions between rhizobia and legume roots hairs. En: Gresshoff PM, Roth LE, Stacey G, Newton WE (Eds). *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*. Chapman and Hall, New York, NY, pp. 239-244.
- Kitagishi K, Yamane I. (1981). *Heavy metal pollution in soils of Japan*. Tokyo: Japan Science Society Press.
- Knauer K, Behra R, Sigg L. (1997). Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 33: 596-601.
- Knight SAB, Labbé S, Kwon LF, Kosman DJ, Thiele DJ. (1996). A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Gene Develop.* 10: 1917-1929.
- Koch KA, Peña MM, Thiele DJ. (1997). Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem. Biol.* 4: 549-560.
- Kochian LV. (1991). Mechanism of micronutrient uptake and translocation in plants. En: Mortvedt JJ (Ed). *Micronutrients Micronutrients in Agriculture*. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 251-270.
- Kopittke PM, Blamey FPC, Menzies NW. (2008). Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant Soil* 303: 217-227.
- Kopittke PM, Dart PJ, Menzies NW. (2007). Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ. Pollut.* 145: 309-315.
- Kopittke PM, Menzies NW. (2006). Effect of Cu on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Soil* 279: 287-296.
- Krämer U, Pickering IJ, Prince RC, Raskin I, Salt DE. (2000). Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiol.* 122: 1343-1353.
- Krüger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell R. (2002). A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* 277: 25062-25069.
- Kuper J, Llamas A, Hecht HJ, Mendel RR, Schwarz G. (2004). Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* 430: 803-806.
- Küpper H, Zhao JF, McGrath SP. (1999). Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 119: 305-311.
- Kurlovich BS. (2002). *Altramuz: Geografía, la clasificación, los recursos genéticos y de reproducción*, San Petersburgo, "Intan", p. 468.
- Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* and proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp-nov. *Canad. J. Microbiol.* 36: 501-505.
- Kyllönen K, Karlsson V, Ruoho-Airola T. (2009). Trace element deposition and trends during a ten year period in Finland. *Sci. Total Environ.* 407: 2260-2269.
- Lanaras T, Moustakas M, Symeonidis L, Diamantoglou S, Karataglis S. (1993). Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. *Physiol. Plant.* 88: 307-314.

- Landi S, Fagioli F. (1983). Efficiency of manganese and copper uptake by excised roots of maize genotypes. *J. Plant Nutr.* 6: 957-970.
- Lang P, Martin R, Golvano MP. (1993). Effect of nitrate on carbon metabolism and nitrogen fixation in root nodules of *Lupinus albus*. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 639-48.
- Lasat MM, Baker AJM, Kochian LV. (1996). Physiological characterization of root Zn^{2+} absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol.* 112: 1715-1722.
- Lehninger AL. (1995). Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura de la estructura y función celular, 2ª Ed. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N. (2010). Response to copper in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 673-682.
- Liao B, Deng D M, Yang B. (2004). Subcellular distribution and chemical forms of Cu in *Commelina communis*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* 43: 72-80.
- Liao MT, Hedley MJ, Woolley DJ, Brooks RR, Nichols MA. (2000). Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rony) plants growth in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant Soil* 223: 243-252.
- Lidon FC, Henriques FS. (1998). Role of rice shoot vacuoles in copper toxicity regulation. *Environ. Exp. Bot.* 39: 197-202.
- Lidon FC, Ramalho J, Henriques CF. (1993). Copper inhibition of rice photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 142: 12-17.
- Lin S, Wu L. (1994). Effects of copper concentration on mineral nutrient uptake and copper accumulation in protein of copper tolerant and nontolerant *Lotus purshianus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29: 214-228.
- Lindley PF. (2001). Proteins of various functions containing copper. En: Bertini I, Sigel A, Sigel H (Eds). *Handbook of Metalloproteins*. CRC Press, Basel, Switzerland, pp. 857-880.
- Lindon FC, Henriques FS. (1992). Effects of excess Mn on photosynthetic pigments in rice plants. *Bot. Bull. Acad. Sinic.* 33: 41-9.
- Lindoo SJ, Caldwell MM. (1978). Ultraviolet-B radiation induced inhibition of leaf expansion and promotion of anthocyanin production. Lack of involvement of the low irradiation phytochrome system. *Plant Physiol.* 61: 278-282.
- Lindsay WL. (1974). Role of chelation in micronutrient availability. En: Carson EW (Ed.). *The Plant Root and its Environment*. University Press of Virginia, Charlottesville, VA, pp. 507-24.
- Ling Z. (2006). Assessment and understanding of copper speciation and phytoavailability/toxicity in acidic waters and soils. Doctoral Thesis. School of Land and Food Sciences and Centre for Mined Land Rehabilitation. The University of Queensland.
- Liu D, Kottke I. (2004). Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS). *Bioresource Technol.* 94: 153-158.
- Liu J, Duan CQ, Zhang XH, Zhu YN, Hu C. (2009). Subcellular distribution of chromium in accumulating plant *Leersia hexandra* Swartz. *Plant Soil* 322: 187-195.
- Liu J, Xiong Z, Li T, Huang H. (2004) Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from Cu contaminated and non-contaminated sites. *Environ. Exp. Bot.* 52: 43-51.
- Llorens N, Arola L, Blade C, Mas A. (2000). Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue-cultured *Vitis vinifera*. *Plant Sci.* 160: 159-163.

- Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP, Young SD, Sacchi GA. (2001). Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol.* 149: 53–60.
- Loneragan JF, Robson AD, Graham RD. (1981). Copper in soils and plants. Academic Press. Sydney.
- Long SR. (1996). *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8: 1885-1898.
- López Arias M, Grau Corbí JM. (2004). Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de los suelos agrícolas. INIA. Madrid. España.
- López-Bellido L, Fuentes M. (1991). El Altramuz. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Córdoba. España.
- López-Bellido L. (2002). Soja. En: Bellido LL (Ed). Cultivos Industriales. Mundi-Prensa, Madrid, pp.755-855
- Lou L, Shen Z, Li X. (2004). The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils. *Environ. Exp. Bot.* 51:111-120.
- Lozano-Rodríguez E, Hernández LE, Bonay P, Carpena-Ruiz RO. (1997). Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *J. Exp. Bot.* 48: 123-128.
- Lozano-Rodríguez E, Liguera M, Lucena JJ, Carpena RO. (1995). Evaluation of two different acid digestion methods in closed systems for trace element determination in plants. *Quím. Anal.* 14: 27-30.
- Lu Y, Allen HE. (2002) Characterisation of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM) – link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg. *Water Res.* 36: 5083-5101.
- Luo Y, Rimmer DL. (1995). Zinc–copper interaction affecting plant growth on metal-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 88: 79-83.
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E. (2001). Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6: 273-282.
- MacFarlane GR, Burchett MD. (2000). Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquatic Bot.* 68: 45-59.
- MacFarlane GR, Burchett MD. (2002). Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Environ. Re.* 54: 65-84.
- Macnair MR, Tilstone GH, Smith SE. (2000). The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. En: Terry N, Banuelos G (Eds). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. CRC Press LLC, pp. 235-50.
- Madigan MY, Martinko JM, Parker J. (2000). *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall. Ninth Ed. P. 725-729.
- Mahe MF, Manfredi E, Ricordeau G, Piacere A, Grosclaude F. (1994). Effects of the alpha-S1-casein polymorphism on goat dairy performances-a within-sire analysis of alpine bucks. *Genet. Sel. Evol.* 26: 151–157.
- Maksymiec W, Russa R, Urbanik-Sypniewska T, Baszynski T. (1994). Effect of excess Cu on the photosynthetic apparatus of runner bean leaves treated at two different growth stages. *Physiol. Plant.* 91: 715-721.
- Maksymiec W. (1997) Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34: 321-342.
- MAPA. (1973). La soja. Dirección General de la Producción Agraria. Ministerio de Agricultura. Madrid, p. 42.

- Marienfeld S, Lehmann H, Stelzer R. (1995). Ultrastructural investigation and EDX-analyses of Al-treated oat (*Avena sativa*) roots. *Plant Soil* 171: 167-173.
- Marschner H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Ed. Academic Press, London.
- Martínez CE, Motto HL. (2000). Solubility of Pb, Zn and Cu added to mineral soils. *Environ. Pollut.* 107: 153-60.
- Marusek CM, Trobaugh NM, Flurkey WH, Inlow JK. (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inor. Bioch.* 100: 108-23.
- Mateos-Aparicio I. (2008). Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de productos funcionales. Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Nutrición y Bromatología II. Universidad Complutense de Madrid.
- Mathialagan T, Viraraghavan T. (2002). Adsorption of cadmium from aqueous solutions by perlite. *J. Hazard. Mater.* 94: 291-303.
- Mathys W. (1977). The role of malate, oxalate and mustard oil glycosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. *Physiol. Plant.* 40: 130-6.
- Matthysse AG, Kijne JW. (1998). Attachment of *Rhizobiaceae* to plant cells. En: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykass PJJ (Eds). *The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associates bacteria*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, pp. 235-249.
- Maunoury N, Kondorosi A, Kondorosi E, Mergaert P. (2008). Cell biology of nodule infection and development. En: Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (Eds). *Nitrogen-Fixing Leguminous Symbiosis*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 153-189.
- Mayz-Figueroa J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4(1): 1-20.
- McBride MB. (1981). Forms and distribution of copper in solid and solution phases of soil. En: Loneragan JF, Robson AD, Graham RD (Eds). *Copper in Soil and Plants*, Academic Press Australia, pp. 25-45.
- McBride MB. (2001). Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *J. Environ. Qual.* 30: 78-84.
- McCarthy I, Romero-Puertas M, Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA. (2001). Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea. *Plant Cell Environ.* 24: 1065-1073.
- McGrath SP, Chaudri AM, Giller KE (1995). Long-term effects and land application of sewage sludge: soils, microorganism and plants. *J. Indust. Microbiol.* 14: 94-104.
- Mendel RR. (2005). Molybdenum: biological activity and metabolism. *Dalton Transactions* 21: 3404-3409.
- Mengel K, Kirkby A. (2001). Principles of Plant Nutrition. 5th Ed. Kluwer Academic Publishers.
- Millar SJ, Goldstein EG, Levine MJ, Hausmannt E. (1986). Modulation of bone metabolism by two chemically distinct lipopolysaccharide fractions from *Bacteroides gingivalis* *Infect. Immun.* 51: 302-306.
- Mira H, Martínez-García F, Peñarrubia L. (2001a). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *Plant J.* 25: 521-528.
- Moustakas M, Lanaras T, Symeonidis L, Karataglis S. (1994). Growth and some photosynthetic characteristics of field grown *Avena sativa* under copper and lead stress. *Photosynthetica* 30: 389-396.
- Mukherjee I, Campbell NH, Ash JS, Connolly EL. (2006). Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* 223: 1178-90.

- Mullen MD, Wolf DC, Beveridge TJ, Bailey GW. (1992). Sorption of heavy metals by soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor ruoxii*. Soil Biol. Biochem. 24: 129-135.
- Muñoz-Guerra LM. (2002). Efecto de la adición de un residuo orgánico sobre la nutrición mineral de los árboles frutales. Modelización informática de la fertilización y el riego. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Murphy A, Taiz L. (1995). Comparison of metallothionein gene expression and non-protein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. Plant Physiol. 109: 945-954.
- Nadal S, Moreno MT, Cubero JI. (2004). Las leguminosas de Grano en la Agricultura Moderna. Mundi-Prensa, Madrid.
- Navari-Izzo F, Quartacci MF. (2001). Phytoremediation of metals: tolerance mechanisms against oxidative stress. Minera. Biotech. 13: 23-83.
- Navarro JP, Aguilar I, López-Moyá JR. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. Ecosistemas. 2007/2.
- Navarro S, Navarro G. (2003). Química Agrícola. Mundi-Prensa, Madrid.
- Naya L, Ladrera R, Ramos J, González EM, Arrese-Igor C, Minchin FR, Becana M (2007). The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. Plant Physiol. 144: 1104-1114.
- Nelson P, Hamblin J, Williams A. (1983). Lupins in Geraldton region. Bull. Nº 4079. West. Aust. Dept. Agric. Australia.
- Nenova V, Stoyanov I. (1999). Physiological and biochemical changes in young maize plants under iron deficiency. 3. Concentration and distribution of some nutrient elements. J. Plant Nutr. 22:565-578.
- Nersissian AM, Shipp EL. (2002). Blue copper-binding domains. Adv. Prot. Chem. 60: 271-340.
- Neumann D, zur Nieden U, Lichtenberger O, Leopold I. (1995). How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentration?. J. Plant Physiol. 146: 704-717.
- Ni C, Chen Y, Lin Q, Tian G. (2005). Subcellular localization of copper in tolerant and non tolerant plant. J. Environ. Sci. 17: 452-456.
- Nishizono H, Watanabe T, Orii T, Suzuki S. (1989). Supresión of inhibitory effects of copper on enzymatic activities by copper-binding substances from *Athyrium yokoscene* assayed in vitro. Plant Cell Physiol. 30: 565-569.
- Nocito FF, Lancilli C, Crema B, Fourcroy P, Davidian JC, Sacchi GA. (2006). Heavy metal stress and sulphate uptake in maize roots. Plant Physiol. 141: 1138-1148.
- Noctor G, Foller CH. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 249-279.
- Norvell WA, Welch RM, Adams ML, Kochian LV. (1993). Reduction of Fe (III), Mn (II), and Cu (II) chelates by roots of pea (*Pisum sativum* L.) or soybean (*Glycine max*). Plant Soil 155/156: 123-126.
- Ouzounidou G, Ciamporova M, Moustakas M, Karataglis S. (1995). Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to Cu stress. I. Growth, mineral content and ultrastructure of root. Environ. Exp. Bot. 35: 167-76.
- Ouzounidou G, Eleftheriou EP, Karataglis S. (1992). Ecophysiological and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum* (Cruciferae). Canad. J. Bot. 70: 947-957.
- Ouzounidou G, Ilias I, Tranopoulou H, Karatalgis S. (1998). Amelioration of copper toxicity by iron on spinach physiology. J. Plant Nutr. 21: 2089-2101.

- Ouzounidou G, Symeonidis L, Babalonas D, Karataglis S. (1994). Comparative responses of a Cu-tolerant and a Cu-sensitive population of *Minuartia hirsuta* to Cu toxicity. J. Plant Physiol. 144: 109-15.
- Palacios Rubio G. (1997). Dinámica y efecto del níquel como contaminante medioambiental en el sistema suelo-planta. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante.
- Palmgren MG. (2001). Plant Plasma Membrane H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 817-45.
- Panou-Filotheou H, Bosabalidis AM, Karataglis S. (2001). Effects of Cu toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). An. Bot. 88: 207-14.
- Panou-Filotheou H, Bosabalidis AM. (2004). Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). Plant Sci. 166: 1497-1504.
- Parker DR, Pedler JF, Ahnstrom ZA, Resketo M. (2001) Reevaluating the free-ion activity of trace metal toxicity toward higher plants: experimental evidence with copper and zinc. Environ. Toxicol. Chem. 20: 899-906.
- Parsons R, Day DA. (1990). Mechanism of soybean nodule adaptation to different oxygen pressures. Plant Cell Environ. 13: 501-512.
- Pasternak T, Rudas V, Potters G, Jansen MAK. (2005). Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Environ. Exp. Bot. 53: 299-314.
- Pastor J, Hernández AJ, Prieto N, s Fernández-Pascual M. (2003). Accumulating behaviour of *Lupinus albus* L. growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. J. Plant Physiol. 160: 1457-1465.
- Pastor J, Hernández AJ. (2006). Comportamiento nutricional del lupino en suelos de mina contaminados por metales pesados. En: Lamfus C, Aparicio PM, Arrese-Igor C, Irigoyen I, Morán JF (Eds). Nutrición mineral. Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales. Universidad Pública de Navarra Vol (II) 709-716.
- Patra M, Sharma A. (2000). Mercury toxicity in plants. Bot. Rev. 66: 379-422.
- Pätsikakä E, KairavuoM, Sersen F, Aro E-M, Tyystjärvi E. (2002). Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. Plant Physiol. 129: 1359-1367.
- Peng HP, Yang XE. (2007). Characteristics of copper and lead uptake and accumulation by two species of *Elsholtzia*. Bull Environ. Contam. Toxicol. 78: 152-157.
- Peng HY, Yang XE, Tian SK. (2005). Accumulation and ultrastructural distribution of copper in *Elsholtzia splendens*. J.f Zhej. Univ. Sci. 6B: 311-318.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(1): 180-201.
- Peterson PJ, Alloway BJ. (1979). The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium (Ed.). Webb, M. Elsevier/North-Holland. Amsterdam, pp. 45-92.
- Phillips DA, Hartwing UA, Maxwell CA, Joseph CM, Werry J, Hungria M, Tsai SM. (1990). En: Gresshoff PM, Roth LE, Stacey G, Newton WE (Eds). Nitrogen Fixation. Achievements and Objectives. Chapman and Hall, New York, NY, pp. 331-338.
- Pich A, Scholz G, Stephan UW. (1994). Iron-dependent changes of heavy metals, nicotianamine, and citrate in different plant organs and in the xylem exudate of two tomato genotypes. Nicotianamine as possible copper translocator. Plant Soil 61: 323-326.
- Pich A, Scholz G. (1996). Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. J. Exp. Bot. 47: 41-47.

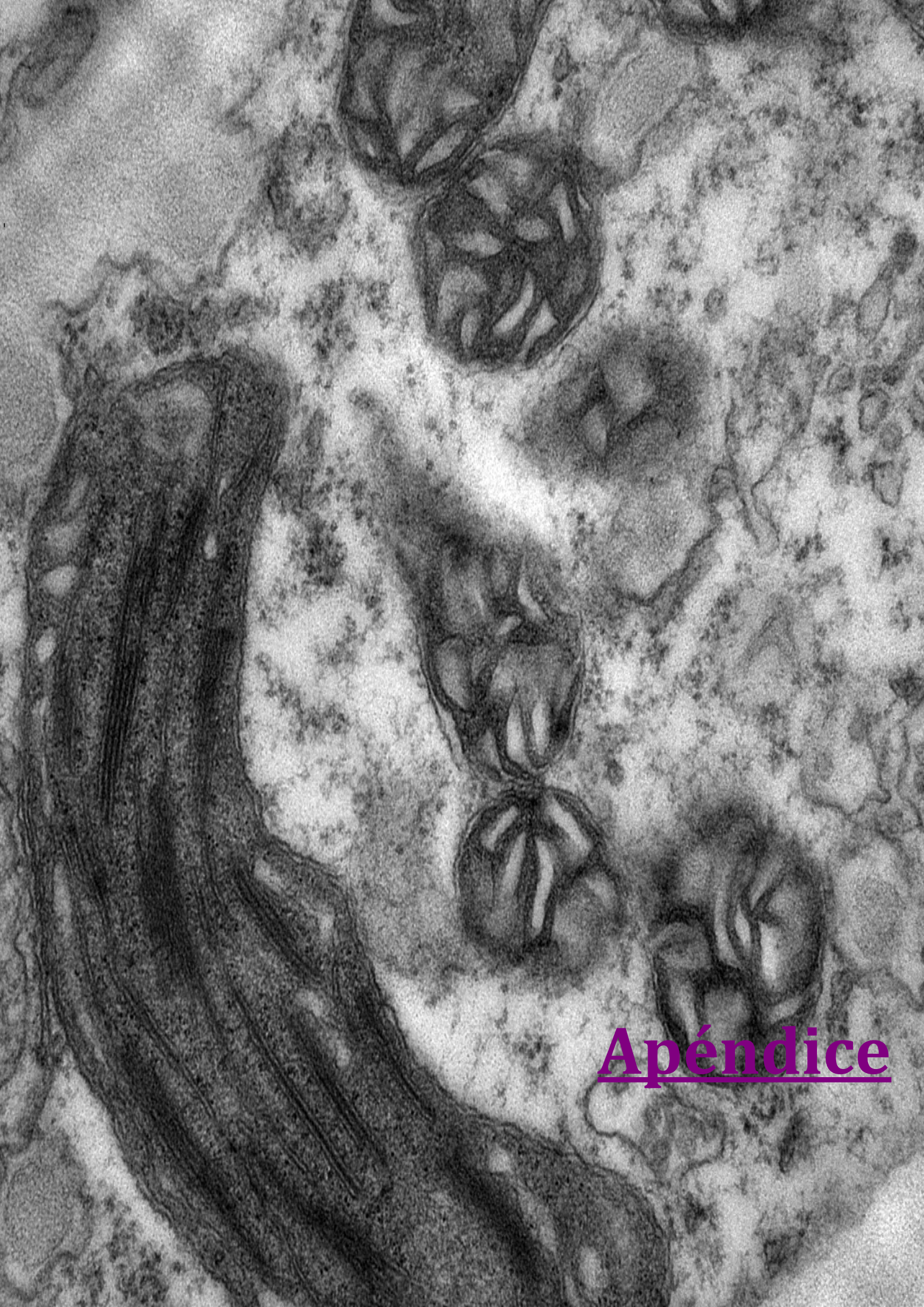
- Plette ACC, Nederlof MM, Temminghoff EJM, van Riemsdijk WH. (1999). Bioavailability of heavy metals in terrestrial and aquatic systems: A quantitative approach. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1882–1890.
- Poschenrieder C, Barceló J. (2003). Estrés por metales pesados. En: Reigosa MJ, Sánchez-Moreiras A (Eds). *La Ecofisiología Vegetal: Una Ciencia de Síntesis*. Paraninfo S.A., pp. 413-42.
- Prasad MNV. (2004). *Heavy Metals Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*. 2nd Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Puertas-Mejía M A, Ruiz-Díez B, Fernández-Pascual Mercedes. (2010). Effect of cadmium ion excess over cell structure and functioning of *Zea mays* and *Hordeum vulgare*. *Biochem. System. Ecol.* 38: 285–291.
- Puig S, Andres-Colas N, Garcia-Molina A, Peñarrubia L. (2007). Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ.* 30:271-290.
- Quartacci MF, Pinzino C, Sgherri CLM, Vecchia FD, Navari-Izzo F. (2000). Growth in excess of copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiol. Plant.* 108: 87-93.
- Rahimi A, Bussler W. (1974). Copper deficiency in higher plants and its histochemical detection. *Landwirtsch Forsch Sonderh* 30:101-111.
- Rau S, Miersch J, Neumann D, Weber E, Krauss GJ. (2006). Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels. *Environ. Exp. Bot.* 59: 299-306.
- Rausser WE. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.* 31: 19-48.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. (1999). *Biology of plants*, Freeman, Worth Busl, pp. 673-701.
- Reeves RD, Baker AJM. (1998). Metal-accumulating plants. En: Ensley BD, Raskin I (Eds). *Phytoremediation of Toxic Metals using Plants to Clean the Environment*. Wiley, New York, pp. 193-230.
- Reichman SM. (2007). The potential use of the legume–*Rhizobium* symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biol. Biochem.* 39: 2587-2593.
- Reid R, Liu J. (2004). Measurement of trace metal influx in plants: a case study with Co. *Funct. Plant Biol.* 31: 941-947.
- Rensing C, Ghosh M, Rosen BP. (2000). CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating Ptype ATPase. *Proceed. Nation. Acad. Sci. USA* 97: 652-656.
- Reuter DJ, Robinson JB. (1997). *Plant Analysis: An Interpretation Manual*. 2nd Ed. CSIRO Publishing.
- Richardson AE, Simson RJ, Djordjevic MA, Rolfe BG. (1988). Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii is affected by low pH, Ca and Al. *Applied Environ. Microbiol.* 54: 2541-2548.
- Ríos ME. (2000). Estudio de aspectos tóxicos y productivos al incorporar 1/10 DL50 de perclorato de lupanina en raciones de pollos. Tesis Doctoral. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Patología Animal. Valdivia-Chile.
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML. (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397: 694-697.
- Robson AD, Reuter DJ. (1981). Diagnosis of copper deficiency and toxicity. En: Loneragan JF, Robson AD, Graham RD, (Eds.). *Copper in Soils and Plants*. Academic Press, London, pp. 287-312.

- Ross SM. (1994). Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. En: Ross SM, (Ed). Toxic Metals in Soil-Plant Systems. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 3-25
- Ruiz-Díez B, Fajardo S, Puertas MA, de Felipe MR, Fernández-Pascual M. (2009). Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. Arch. Microbiol. 191: 35-46.
- Sancenón V, Puig S, Mateu-Andrés I, Dorcsey E, Thiele DJ, Peñarrubia L. (2004). The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. J. Biol. Chem. 279: 15348-15355.
- Sancenón V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Peñarrubia L. (2003). Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 51: 577-587.
- Sánchez-Pardo B, Carpena RO, Zornoza P. (2010). Localisation of Cu and Fe in nodules of Cu-stressed soybean plants determined by energy-dispersive X-ray microanalysis. XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Zaragoza, España, p. 249.
- Sánchez-Pardo B, Carpena-Ruiz RO, Zornoza P. (2008). Respuestas de toxicidad y tolerancia de la planta de altramuz a dosis elevadas de Mn, Cu, Zn y Cd. En: Mateos L, Ruiz JM (Eds). Proc. XII Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas. Vol. I: 583-592. SEFV-Universidad de Granada. Granada, España.
- Sánchez-Pardo B. (2007). Respuesta de la planta de altramuz a dosis elevadas de Mn, Cu, Zn y Cd. Transporte, distribución e interacciones entre nutrientes. Tesis de Máster. Universidad Autónoma de Madrid.
- Sanità di Toppi L, Grabbrielli R. (1999). Response to Cd in higher plants. Environ. Exp. Bot. 41: 105-30.
- Sayyari-Zahan MH, Sadana US, Steingrobe B, Claassen N. (2009). Manganese efficiency and manganese-uptake kinetic of raya (*Brassica juncea*), wheat (*Triticum aestivum*) and oat (*Avena sativa*) grown in nutrient solution and soil. J. Plant Nutr. Soil Sci. 172: 425-434.
- Schützendübel A, Polle A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. J. Exp. Bot. 53: 1351-1365.
- Sela M, Tel-Or E, Fritz E, Huttermann A. (1988). Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla*. Plant Physiol. 88: 30-36.
- Senden MHMN, Van Paassen FJM, Van Der Meer AJGM, Wolterbeek H. (1990). Cadmium-citric acid-xylem cell wall interactions in tomato plants. Plant Cell Environ. 15: 71-79.
- Shi J, Yuan X, Chen X, Wu B, Huang Y, Chen Y. (2011). Copper uptake and its effect on metal distribution in root growth zones of *Commelina communis* revealed by SRXRF. Biol. Trace Elem. Res. 141:294-304.
- Shi JY, Chen YX, Huang YY, He W. (2004). SRXRF microprobe as a technique for studying elements distribution in *Elsholtzia splendens*. Micron. 35: 557-564.
- Shiyab S, Chen J, Han FX, Monts D, Matta FB, Gu M, Su Yi. (2009). Phytotoxicity of mercury in indian mustard (*Brassica juncea* L.). Ecotoxicol. Environ. Saf. 72: 619-625.
- Singleton VL, Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Viticul. 16: 144-153.
- Sobrino-Vasperinas E. (1991). El cultivo de soja. Una alternativa para los cultivos de regadío extremeños. Agricultura pp. 75-80.
- Soltanpour PN, Schwab AP. (1977). A new soil test for simultaneous extraction of macro- and micronutrients in alkaline soils. Comm. Soil Sci. Plant Anal. 8: 195-207.
- Sprent JI, James EK. (2007). Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in. Plant Physiol. 144: 575-581.

- Sridhar BBM, Diehl SV, Han FX, Monts DL, Su Y. (2005). Anatomical changes due to uptake and accumulation of zinc and cadmium in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ. Exp. Bot.* 54: 131-141.
- Steffens JC. (1990). The heavy metals-binding peptides of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 553-75.
- Stevenson FJ, Fitch A. (1981). Reaction with organic matter. En: Loneragan JF, Robson AD, Graham RD, (Eds). *Copper in Soil and Plants*. Academia Press, New Cork, p. 69.
- Stiborova M, Dubravova M, Brezinova A, Friedrich A. (1986). Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley. *Photosynthetica* 20: 418-425.
- Strange J, Macnair MR. (1991). Evidence for a role for the cell membrane in Cu tolerance of *Mimulus guttatus* Fischer ex DC. *New Phytol.* 119: 383-388.
- Su Y, Han FX, Sridhar BBM, Monts DL. (2005). Phytotoxicity and phytoaccumulation of trivalent and hexavalent chromium in brake fern. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 2019-2026.
- Taiz L, Zeiger E. (2002). *Plant Physiology*. 3rd Ed. Sinauer, New York, NY.
- Takhatajan A. (1996). *Diversity and Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press. NY.
- Tewari RK, Kumar P, Sharma PN. (2006). Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stresses mulberry plants. *Planta* 223: 1145-1153.
- Turnau K, Kottke I, Oberwinkler F. (1993). *Paxillus involutus*-*Pinus sylvestris* mycorrhizae from heavily polluted forest. *Bot. Acts* 106: 213-9.
- Van Hoof NA, Koevoets PL, Hakvoort HW, Ten Bookum WM, Schat H, Verkleij JA, Ernst WH. (2001). Enhanced ATP-dependent copper efflux across the root cell plasma membrane in copper-tolerant *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.* 113: 225-232.
- Vance CP, Graham PH, Allan DL. (2000). Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. En: Pedrosa FO, Hungria M, Yates MG, Newton WE (Eds), *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 506–514.
- Vassilev A, Berova M, Zlatev Z. (1998). Influence of Cd²⁺ on growth, chlorophyll content and water relations in young barley plants. *Biol. Plant.* 41: 601-606.
- Vassilev A, Lidon FC, Matos MC, Ramalho JC, Yordanov I. (2002). Photosynthetic performance and some nutrients content in cadmium and copper treated barley plants. *J. Plant Nutr.* 25: 2343-2360.
- Vassilev A, Yordanov I. (1997). Reductive analysis of factors limiting growth of Cd-treated plants: A review. *Bulg. J. Plant Physiol.* 23: 114-133.
- Vázquez MD, Barceló J, Poschenrieder Ch, Mádico J, Hatton P, Baker AJM, Cope GH. (1992). Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte than can hyperaccumulate both metals. *J. Plant Physiol.* 140: 350-355.
- Vázquez MD, Poschenrieder Ch, Barceló J. (1987). Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Bot.* 59: 427-438.
- Vázquez MD, Poschenrieder Ch, Barceló J. (1992). Ultra-structural effects and localization of low cadmium concentration of bean roots, *New Phytol.* 120: 215-226.
- Vázquez S, Agha R, Granado A, Sarro M J, Esteban E, Peñalosa J M, Carpena RO. (2006). Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water Air Soil Pollut.* 177: 349-365.
- Vázquez S, Carpena-Ruiz R. (2005). Use of perlite in cadmium plant studies: an approach to polluted soil conditions. *J. Environ. Monit.* 7: 1355-1358.

- Vázquez S, Fernández-Pascual M, Sánchez-Pardo B, Carpena RO, Zornoza P. (2007). Subcellular compartmentalisation of cadmium in white lupin determined by energy-dispersive X-ray microanalysis. *J Plant Physiol.* 164: 1235-1238.
- Vázquez S, Goldsbrough P, Carpena O. (2006). Assessing the relative contributions of phytochelatins and the cell wall to cadmium resistance in white lupin. *Physiol. Plant.* 128: 487-495.
- Vedina O, Toma S. (2000). Forms of microelements in apple leaves under different conditions of iron and zinc nutrition. *J Plant Nutr.* 23: 1135-1143.
- Veltrup W. (1976). Concentration dependent uptake of copper by barley roots. *Physiol. Plant.* 36: 217-220.
- Veltrup W. (1978). Characteristics of zinc uptake by barley roots. *Physiol. Plant.* 42(2): 190-194.
- Venturi G, Amaducci MT. (1988). *La soja*. Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Verkleij JAC, Golan-Goldhirst A, Antosiewicz DM, Schwitzguébel J-P, Schröder P. (2009). Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environ. Exp. Bot.* 67: 10-22.
- Vesk PA. (1998). Trace metal accumulation in the Water Hyacinth *Eichhornia crassipes* (Mart.) Kensington Pond, Centennial Park, Sydney. M.Sc. Thesis, University of Sydney.
- Vieira RF, Silva CMMS, Silveira APD. (2007). Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. *Plant Soil* 300:95–103.
- Vigue GT, Pepper IL, Bezdicek DF. (1981). Effect of cadmium on nodulation and $N_2(C_2H_2)$ - fixation by dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Environ. Qual.* 10:87-90.
- Villagra R. (1996). Estudio comparativo de semillas de *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius* en la alimentación de ponedoras desde Inicio de postura hasta la semana 47 de producción. Tesis Doctoral. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia-Chile.
- Villar R, Ruíz-Robledo J, Quero J, Pooter H, Valladares F, Marañón T. (2004). Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. En: Valladares F (Ed.). *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S.A., Madrid, pp 191-227.
- Vivo A, Andreu JM, de la Viña S, de Felipe MR. (1989). Leghemoglobin in lupin plants (*Lupinus albus* L. cv Multolupa). *Plant Physiol.* 90: 452-457.
- Wallace A, Cha JW. 1989. Interactions involving copper toxicity and phosphorus deficiency in bush bean plants grown in solutions of low and high pH. *Soil Sci.* 147: 430-431.
- Wang X, Liu Y, Zeng G, Chai L, Song X, Min Z, Xiao X. (2008). Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Beckhamia nivea* (L.) Gaud. *Environ. Exp. Bot.* 62: 389-395.
- Weigel M, Varotto C, Pesaresi P, Finazzi G, Rappaport F, Salamini F, Leister D. (2003). Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278: 31286-31289.
- Weisa JS, Glover T, Weis T. (2004). Interactions of metals affect their distribution in tissues of *Phragmites australis*. *Environ. Pollut.* 131:409-415.
- Wellburn AR. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.
- Weng G, Wu L, Wang Z, Luo Y, Christie P. (2005). Copper uptake by four *Elsholtzia* ecotypes with varying levels of copper in solution culture. *Environ. Internat.* 31: 880-884.
- Wintz H, Fox T, Wu Y-Y, Feng V, Chen W, Chang H-S, Zhu T, Vulpe C. (2003). Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278: 47644-47653.

- Wolterbeek HT, Van Der Meer AJ. (2002). Transport rate of arsenic, cadmium, copper and zinc in *Potamogeton pectinatus* L.: radiotracer experiments with ⁷⁶As, ^{109,115}Cd, ⁶⁴Cu and ^{65,69}Zn. *Sci. Total Environ.* 287: 13-30.
- Woolhouse HW. (1983). Toxicity and tolerance in the response of plants to metals. En: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (Eds). *Physiological Plant Ecology III. Responses to the Chemical and Biological Environment. Encyclopaedia of Plant New Series*, Vol. 12 C. Springer Verlag. Berlin, pp. 245-300.
- Wu F, Dong J, Cai Y, Chen F, Zhang G. (2007). Differences in Mn uptake and subcellular distribution in different barley genotypes as a response to Cd toxicity. *Sci. Total Environ.* 385: 228-234.
- Wu FB, Dong J, Qiu Qian Q, Zhang G. (2005). Subcellular distribution and chemical form of Cd and Cd-Zn interaction in different barley genotypes. *Chemosphere* 60: 1437-1446.
- Wu H, Li L, Du J, Yuan Y, Cheng X, Ling H-Q. (2005). Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 46: 1505-1514.
- Wu L, Antonovics J. (1975). Zinc and copper uptake by *Agrostis stolonifera*, tolerant to both zinc and copper. *New Phytol.* 75: 231-237.
- Xiong ZT, Liu C, Geng B. (2006). Phytotoxic effect of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64: 273-280.
- Xu J, Yang L, Wang Z, Dong G, Huang J, Wang Y. (2006). Toxicity of Cu on rice growth and accumulation of Cu in rice grain in Cu contaminated soil. *Chemosphere* 62: 602-607.
- Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H. (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 45: 706-711.
- Yang H, Pritzker M, Fung SY, Sheng Y, Wang W, Chen P. (2006). Anion effect on the nanostructure of a metal ion binding self-assembling peptide. *Langmuir* 22: 8553-62.
- Yang H, Wong JW, Yang ZM, Zhou LX. (2001). Ability of *Arogyron elongatum* to accumulate the single metal of cadmium, copper, nickel and lead and root exudation of organic acids. *J. Environ. Sci.* 13: 368-375.
- Yi Y, Guerinot ML. (1996). Genetic evidence that Fe(III)-chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J.* 10: 835-844.
- Yruela I, Pueyo JJ, Alonso PJ, Picorell R. (1996). Photoinhibition of photosystem II from higher plants: effects of copper inhibition. *J. Biol. Chem.* 271: 7408-7415.
- Yruela I. (2005). Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17: 145-156.
- Yruela I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct. Plant Biol.* 36:409-430.
- Zahran HH. (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J. Biotechnol.* 91: 143-153.
- Zhao FJ, Hamon R, Lombi E, McLaughlin MJ, McGrath SP. (2002). Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 53: 535-543.
- Zornoza P, Sánchez-Pardo B, Carpena RO. (2010). Interaction and accumulation of manganese and cadmium in the manganese accumulator *Lupinus albus*. *J. Plant Physiol.* 167: 1027-1032.
- Zornoza P, Vázquez S, Esteban E, Fernández-Pascual M, Carpena R. (2002). Cadmium-stress in nodulated white lupin: Strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 1003-1009.



Apéndice

Capítulo I. Cinéticas de absorción de Cu por raíces aisladas de altramuz y soja

Tabla I.1. Parámetros cinéticos de absorción de Cu en raíces de altramuz y soja

	Parámetros cinéticos			
	V_{\max} ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	K_m (μM)	Componente lineal ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	R^2
<i>Altramuz</i>				
Absorción neta (20°C)	9,30 ± 0,41	683,16 ± 76,83	----	0,996***
Absorción apoplástica (< 4°C)	6,26 ± 0,16	777,69 ± 48,36	----	0,999***
Absorción metabólica	3,20 ± 0,48	517,50 ± 21,81	----	0,938***
<i>Soja</i>				
Absorción neta (20°C)	7,28 ± 0,24	325,07 ± 32,84	----	0,995***
Absorción apoplástica (< 4°C)	6,42 ± 0,30	540,18 ± 22,43	----	0,999***
Absorción metabólica	1,22 ± 0,07	97,64 ± 9,52	----	0,975***

Tabla I.2. Parámetros cinéticos de absorción de Cu en presencia de Zn en raíces de altramuz y soja

	Parámetros cinéticos			
	V_{\max} ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	K_m (μM)	Componente lineal ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	R^2
<i>Altramuz</i>				
Absorción neta (20°C)	8,23 ± 0,23	738,57 ± 50,57	----	0,998***
Absorción apoplástica (< 4°C)	6,57 ± 0,13	854,38 ± 38,47	----	0,999***
Absorción metabólica	1,52 ± 0,18	412,37 ± 44,24	----	0,954***
<i>Soja</i>				
Absorción neta (20°C)	5,22 ± 0,04	170,69 ± 18,96	0,0020 ± 0,0003	0,994***
Absorción apoplástica (< 4°C)	5,96 ± 0,36	356,54 ± 24,68	----	0,985***
Absorción metabólica	1,21 ± 0,15	122,75 ± 24,09	0,0010 ± 0,0002	0,992***

Tabla I.3. Parámetros cinéticos de absorción de Cu en presencia de Mn en raíces de altramuz y soja

	Parámetros cinéticos			
	V_{\max} ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	K_m (μM)	Componente lineal ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$)	R^2
<i>Altramuz</i>				
Absorción neta (20°C)	9,63 ± 0,37	1348,34 ± 104,80	----	0,998***
Absorción apoplástica (< 4°C)	5,58 ± 0,07	1073,15 ± 29,34	----	0,999***
Absorción metabólica	0,80 ± 0,04	304,26 ± 16,90	0,0007 ± 0,0000	0,996***
<i>Soja</i>				
Absorción neta (20°C)	2,32 ± 0,18	87,99 ± 6,50	0,0030 ± 0,0000	0,999***
Absorción apoplástica (< 4°C)	7,88 ± 0,72	912,56 ± 92,88	----	0,984***
Absorción metabólica	0,24 ± 0,02	2,12 ± 0,18	0,0010 ± 0,0000	0,992***

Tabla I.4. Parámetros cinéticos de absorción de Cu en presencia de Cd en raíces de altramuz y soja

	Parámetros cinéticos			
	V_{\max} ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$)	K_m (μM)	Componente lineal ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$)	R^2
<i>Altramuz</i>				
Absorción neta (20°C)	6,05 ± 0,17	365,46 ± 30,78	----	0,997***
Absorción apoplástica (< 4°C)	5,02 ± 0,31	508,53 ± 35,31	----	0,988***
Absorción metabólica	1,30 ± 0,06	232,11 ± 26,62	----	0,811**
<i>Soja</i>				
Absorción neta (20°C)	8,69 ± 0,42	298,06 ± 15,40	----	0,989***
Absorción apoplástica (< 4°C)	6,24 ± 0,27	317,65 ± 22,92	----	0,991***
Absorción metabólica	1,75 ± 0,10	258,77 ± 29,41	0,0003 ± 0,0000	0,980***

Capítulo II. Cinéticas de absorción de Cu a medio plazo y respuestas al estrés por Cu en plantas de altramuz y soja

Tabla II.1. Efecto de la dosis de Cu sobre los pesos frescos de vástago y raíz de altramuz y soja (g planta^{-1}). Los datos son las medias ± E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

	Dosis Cu (μM)						
	1,6	3	5	7	10	13	16
<i>Altramuz</i>							
Vástago	7,94 ± 0,29 ^a	8,33 ± 0,17 ^a	8,08 ± 0,29 ^a	7,72 ± 0,26 ^a	7,66 ± 0,21 ^a	7,57 ± 0,24 ^a	7,04 ± 0,32 ^b
Raíz	4,79 ± 0,21 ^a	4,66 ± 0,27 ^a	4,62 ± 0,27 ^a	4,54 ± 0,23 ^a	4,47 ± 0,25 ^a	4,48 ± 0,34 ^a	4,01 ± 0,33 ^a
<i>Soja</i>							
Vástago	16,78 ± 0,98 ^a	17,07 ± 0,37 ^a	17,17 ± 0,84 ^a	16,53 ± 0,44 ^a	15,54 ± 0,96 ^a	15,03 ± 0,79 ^a	13,37 ± 0,41 ^b
Raíz	12,04 ± 0,80 ^a	11,49 ± 0,45 ^a	11,29 ± 0,83 ^a	10,44 ± 0,56 ^a	10,68 ± 0,62 ^a	9,61 ± 0,72 ^a	8,07 ± 0,33 ^b

Capítulo III. Ecotoxicidad y bioacumulación de Cu en plantas de altramuz y soja

Tabla III.1. Absorción neta de Cu ($\mu\text{mol Cu planta}^{-1} \text{ día}^{-1}$) en plantas de altramuz y soja con dosis crecientes de Cu (1,6-144 μM). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Dosis de Cu (μM)	Especie vegetal	
	<i>Altramuz</i>	<i>Soja</i>
1,6	0,013 \pm 0,001 ^a	0,022 \pm 0,001 ^a
16	0,045 \pm 0,003 ^a	0,066 \pm 0,001 ^a
32	0,173 \pm 0,006 ^b	0,229 \pm 0,004 ^b
48	0,339 \pm 0,009 ^c	0,435 \pm 0,015 ^c
64	0,447 \pm 0,017 ^d	0,568 \pm 0,033 ^c
80	0,533 \pm 0,029 ^e	0,908 \pm 0,019 ^d
96	0,690 \pm 0,015 ^f	1,007 \pm 0,032 ^d
112	0,714 \pm 0,015 ^{fg}	1,007 \pm 0,038 ^d
128	0,789 \pm 0,061 ^g	1,411 \pm 0,095 ^e
144	0,756 \pm 0,035 ^{fg}	1,351 \pm 0,112 ^e

Tabla III.2. Índices de eficacia de Cu en plantas de altramuz y soja sometidas a diferentes dosis de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Dosis de Cu (μM)	Acumulación efectiva _{total} (%)	Acumulación efectiva _{vástago} (%)	Translocación (%)	[Cu] _{vástago} /[Cu] _{raíz} (%)
<i>Altramuz</i>				
1,6	25,1 \pm 1,3 ^a	14,0 \pm 0,5 ^a	55,8 \pm 1,7 ^a	99,8 \pm 5,3 ^a
32	16,4 \pm 0,6 ^{de}	1,7 \pm 0,1 ^b	10,3 \pm 0,3 ^c	8,1 \pm 0,3 ^c
48	21,4 \pm 0,6 ^b	1,4 \pm 0,1 ^{bc}	6,7 \pm 0,6 ^d	7,0 \pm 1,0 ^c
64	21,2 \pm 0,8 ^{bc}	1,1 \pm 0,1 ^{bcd}	5,3 \pm 0,6 ^{de}	4,6 \pm 0,4 ^c
80	21,2 \pm 0,5 ^{bc}	1,0 \pm 0,1 ^{cd}	4,8 \pm 0,1 ^{de}	4,1 \pm 0,1 ^c
96	21,8 \pm 0,5 ^b	0,8 \pm 0,1 ^{cd}	3,7 \pm 0,5 ^e	3,7 \pm 0,7 ^c
112	19,4 \pm 0,4 ^{bc}	0,7 \pm 0,1 ^d	3,4 \pm 0,3 ^e	3,2 \pm 0,2 ^c
128	18,7 \pm 1,4 ^{cd}	1,4 \pm 0,1 ^{bc}	6,6 \pm 0,6 ^d	6,5 \pm 1,0 ^c
144	15,9 \pm 0,7 ^e	0,9 \pm 0,1 ^{cd}	6,1 \pm 0,4 ^{de}	7,3 \pm 1,3 ^c
<i>Soja</i>				
1,6	41,2 \pm 2,4 ^a	17,4 \pm 0,5 ^a	42,5 \pm 1,4 ^a	38,2 \pm 1,3 ^a
32	21,7 \pm 0,4 ^e	1,8 \pm 0,1 ^c	8,1 \pm 0,7 ^{cdef}	6,4 \pm 0,4 ^{bc}
48	27,5 \pm 1,0 ^{cd}	1,5 \pm 0,2 ^c	5,6 \pm 0,9 ^f	5,1 \pm 0,9 ^{cd}
64	26,9 \pm 1,6 ^d	1,7 \pm 0,2 ^c	6,4 \pm 0,3 ^{ef}	5,8 \pm 0,2 ^{bc}
80	32,5 \pm 1,8 ^{bc}	3,3 \pm 0,2 ^b	9,6 \pm 0,5 ^{cd}	7,0 \pm 0,3 ^b
96	31,8 \pm 1,0 ^{bcd}	3,3 \pm 0,5 ^b	10,3 \pm 1,2 ^c	7,0 \pm 0,3 ^b
112	27,3 \pm 1,0 ^d	2,3 \pm 0,1 ^c	8,5 \pm 0,3 ^{cde}	6,4 \pm 0,0 ^{bc}
128	33,4 \pm 2,3 ^b	1,9 \pm 0,2 ^c	5,7 \pm 0,3 ^f	3,8 \pm 0,3 ^d
144	30,1 \pm 2,4 ^{bcd}	2,1 \pm 0,1 ^c	6,7 \pm 0,4 ^{def}	5,3 \pm 0,1 ^{bc}

Tabla III.3. Concentración de Cu (mg kg⁻¹ MS) en vástago y raíz de altramuz y soja tratadas con dosis crecientes de Cu (1,6-144 µM). Los resultados son las medias ± el E.T. (n = 4). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan (P < 0,05)

Dosis de Cu (µM)	<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
	Vástago	Raíz	Vástago	Raíz
1,6	11,84 ± 0,32 ^a	19,42 ± 0,65 ^a	8,62 ± 0,55 ^a	39,17 ± 3,28 ^a
16	15,13 ± 0,69 ^a	91,45 ± 2,45 ^a	11,82 ± 0,39 ^{ab}	171,19 ± 3,25 ^a
32	33,01 ± 1,75 ^a	654,49 ± 26,01 ^b	27,87 ± 1,03 ^{bc}	780,45 ± 8,77 ^b
48	55,71 ± 2,92 ^b	1524,10 ± 40,17 ^c	42,78 ± 2,21 ^c	1581,80 ± 12,52 ^c
64	62,58 ± 3,90 ^b	2508,44 ± 93,05 ^d	73,62 ± 1,87 ^d	2475,86 ± 99,72 ^d
80	65,18 ± 1,51 ^b	2673,80 ± 59,37 ^d	146,80 ± 2,57 ^e	3880,34 ± 182,39 ^e
96	58,73 ± 1,16 ^b	3380,06 ± 37,73 ^e	182,42 ± 7,63 ^f	4952,97 ± 88,73 ^f
112	70,56 ± 4,68 ^b	3799,22 ± 84,62 ^f	195,15 ± 6,83 ^f	5966,79 ± 204,17 ^g
128	140,52 ± 9,04 ^c	4358,94 ± 236,49 ^g	194,59 ± 10,89 ^f	10077,72 ± 265,84 ^h
144	145,19 ± 12,15 ^c	4257,84 ± 86,49 ^g	293,66 ± 4,47 ^g	10661,16 ± 136,23 ⁱ

Tabla III.4. Peso seco (g MS planta⁻¹) de plantas de altramuz y soja tratadas con dosis crecientes de Cu (1,6-144 µM). Los resultados son las medias ± el E.T. (n = 4). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan (P < 0,05)

Dosis de Cu (µM)	órganos de la planta				
	Hojas	Tallos	Vástago	Raíz	Total
<i>Altramuz</i>					
1,6	0,239 ± 0,009 ^a	0,038 ± 0,003 ^{bc}	0,278 ± 0,011 ^a	0,134 ± 0,008 ^a	0,412 ± 0,018 ^a
16	0,214 ± 0,011 ^b	0,040 ± 0,002 ^a	0,254 ± 0,012 ^{ab}	0,122 ± 0,012 ^a	0,376 ± 0,023 ^{ab}
32	0,200 ± 0,005 ^b	0,040 ± 0,001 ^a	0,240 ± 0,006 ^b	0,106 ± 0,003 ^b	0,346 ± 0,010 ^b
48	0,149 ± 0,008 ^c	0,033 ± 0,004 ^{bc}	0,182 ± 0,011 ^c	0,093 ± 0,003 ^{bc}	0,274 ± 0,013 ^c
64	0,143 ± 0,006 ^{cd}	0,025 ± 0,002 ^d	0,168 ± 0,008 ^{cd}	0,075 ± 0,001 ^d	0,243 ± 0,007 ^{cd}
80	0,147 ± 0,007 ^{cd}	0,027 ± 0,001 ^{cd}	0,173 ± 0,008 ^{cd}	0,084 ± 0,003 ^{cd}	0,258 ± 0,011 ^{cd}
96	0,138 ± 0,003 ^{cd}	0,024 ± 0,001 ^d	0,162 ± 0,004 ^{cd}	0,088 ± 0,001 ^{cd}	0,249 ± 0,004 ^{cd}
112	0,135 ± 0,010 ^{cd}	0,020 ± 0,001 ^d	0,155 ± 0,011 ^{cd}	0,081 ± 0,002 ^e	0,236 ± 0,013 ^{cd}
128	0,126 ± 0,004 ^{cd}	0,022 ± 0,002 ^d	0,148 ± 0,005 ^d	0,075 ± 0,002 ^e	0,222 ± 0,005 ^e
144	0,123 ± 0,009 ^d	0,023 ± 0,002 ^d	0,145 ± 0,010 ^d	0,073 ± 0,003 ^e	0,219 ± 0,011 ^e
<i>Soja</i>					
1,6	0,306 ± 0,013 ^a	0,171 ± 0,009 ^a	0,477 ± 0,021 ^a	0,142 ± 0,002 ^a	0,619 ± 0,022 ^a
16	0,262 ± 0,012 ^b	0,122 ± 0,005 ^b	0,384 ± 0,015 ^b	0,132 ± 0,007 ^a	0,516 ± 0,020 ^b
32	0,178 ± 0,008 ^c	0,117 ± 0,009 ^{bc}	0,294 ± 0,014 ^c	0,120 ± 0,002 ^b	0,414 ± 0,013 ^c
48	0,143 ± 0,005 ^{de}	0,110 ± 0,002 ^{bc}	0,254 ± 0,007 ^{cd}	0,116 ± 0,004 ^b	0,369 ± 0,011 ^{cd}
64	0,118 ± 0,011 ^{ef}	0,102 ± 0,004 ^{cd}	0,220 ± 0,015 ^{de}	0,096 ± 0,005 ^c	0,316 ± 0,017 ^e
80	0,163 ± 0,010 ^{cd}	0,101 ± 0,006 ^{cd}	0,264 ± 0,015 ^{cd}	0,095 ± 0,004 ^c	0,359 ± 0,013 ^{de}
96	0,150 ± 0,018 ^{cd}	0,103 ± 0,008 ^{cd}	0,253 ± 0,026 ^{cd}	0,081 ± 0,003 ^d	0,334 ± 0,029 ^{de}
112	0,110 ± 0,002 ^f	0,086 ± 0,003 ^{de}	0,196 ± 0,003 ^{ef}	0,069 ± 0,004 ^e	0,265 ± 0,006 ^f
128	0,101 ± 0,006 ^f	0,082 ± 0,003 ^e	0,183 ± 0,008 ^{ef}	0,059 ± 0,005 ^{ef}	0,242 ± 0,012 ^f
144	0,095 ± 0,009 ^f	0,066 ± 0,002 ^e	0,160 ± 0,007 ^f	0,056 ± 0,001 ^f	0,215 ± 0,006 ^f

Tabla III.5. Cociente entre el $BAF_{\text{vástago}}$ y $BAF_{\text{raíz}}$ en plantas de altramuz y soja tratadas con dosis crecientes de Cu (1,6-144 μM). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Dosis de Cu (μM)	Especie vegetal	
	<i>Altramuz</i>	<i>Soja</i>
1,6	$1,274 \pm 0,086^a$	$0,740 \pm 0,041^a$
16	$0,642 \pm 0,027^b$	$0,135 \pm 0,003^b$
32	$0,114 \pm 0,003^c$	$0,088 \pm 0,009^{cd}$
48	$0,072 \pm 0,007^c$	$0,059 \pm 0,010^d$
64	$0,057 \pm 0,007^c$	$0,069 \pm 0,004^{cd}$
80	$0,050 \pm 0,001^c$	$0,106 \pm 0,006^{bcd}$
96	$0,038 \pm 0,005^c$	$0,116 \pm 0,015^{bc}$
112	$0,036 \pm 0,004^c$	$0,093 \pm 0,003^{bcd}$
128	$0,071 \pm 0,007^c$	$0,042 \pm 0,004^d$
144	$0,077 \pm 0,013^c$	$0,074 \pm 0,003^{cd}$

Tabla III.6. Absorción neta e índices de eficacia de Fe en plantas de altramuz y soja sometidas a diferentes dosis de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Dosis de Cu (μM)	Absorción neta ($\mu\text{mol planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	Acumulación efectiva ^{total} (%)	Acumulación efectiva ^{vástago} (%)	Translocación (%)	$[\text{Fe}]_{\text{vástago}}/[\text{Fe}]_{\text{Raíz}}$ (%)
<i>Altramuz</i>					
1,6	$0,453 \pm 0,045^a$	$38,3 \pm 3,8^a$	$13,7 \pm 1,2^a$	$36,1 \pm 1,3^a$	$49,7 \pm 4,5^{ab}$
32	$0,200 \pm 0,024^{bc}$	$16,9 \pm 2,0^b$	$4,4 \pm 0,4^c$	$26,3 \pm 1,0^b$	$40,3 \pm 3,3^a$
48	$0,210 \pm 0,006^b$	$17,7 \pm 0,5^b$	$6,1 \pm 0,4^b$	$34,2 \pm 1,7^a$	$72,3 \pm 6,0^c$
64	$0,175 \pm 0,007^{bc}$	$14,8 \pm 0,6^{bc}$	$5,3 \pm 0,0^{bc}$	$35,9 \pm 1,3^a$	$78,7 \pm 4,6^{cd}$
80	$0,184 \pm 0,001^{bc}$	$15,6 \pm 0,1^{bc}$	$4,0 \pm 0,2^c$	$25,9 \pm 0,9^b$	$51,9 \pm 1,0^{ab}$
96	$0,180 \pm 0,015^{bc}$	$15,2 \pm 1,3^{bc}$	$4,1 \pm 0,3^c$	$27,6 \pm 2,9^b$	$57,1 \pm 7,7^b$
112	$0,197 \pm 0,007^{bc}$	$16,7 \pm 0,6^{bc}$	$4,0 \pm 0,2^c$	$24,0 \pm 1,4^b$	$56,1 \pm 3,4^b$
128	$0,164 \pm 0,017^{bc}$	$13,8 \pm 1,4^{bc}$	$4,7 \pm 0,4^{bc}$	$34,6 \pm 0,9^a$	$91,3 \pm 6,4^d$
144	$0,135 \pm 0,012^c$	$11,4 \pm 1,0^c$	$3,9 \pm 0,4^c$	$34,1 \pm 0,9^a$	$90,6 \pm 3,0^d$
<i>Soja</i>					
1,6	$0,117 \pm 0,007^a$	$9,9 \pm 0,6^a$	$6,7 \pm 0,5^a$	$67,8 \pm 1,5^a$	$109,7 \pm 6,4^{ab}$
32	$0,058 \pm 0,005^{cd}$	$4,9 \pm 0,4^{cd}$	$3,2 \pm 0,3^{bc}$	$64,0 \pm 2,3^a$	$133,1 \pm 7,4^a$
48	$0,061 \pm 0,004^{cd}$	$5,2 \pm 0,3^{cd}$	$3,2 \pm 0,3^{bc}$	$62,2 \pm 2,2^{ab}$	$143,4 \pm 13,8^a$
64	$0,050 \pm 0,003^d$	$4,2 \pm 0,3^d$	$2,4 \pm 0,2^c$	$58,0 \pm 1,8^{ab}$	$118,2 \pm 13,8^{ab}$
80	$0,070 \pm 0,002^{bc}$	$5,9 \pm 0,2^{bc}$	$3,7 \pm 0,4^{bc}$	$62,6 \pm 7,6^a$	$121,2 \pm 30,3^{ab}$
96	$0,081 \pm 0,007^b$	$6,8 \pm 0,6^b$	$4,1 \pm 0,6^b$	$59,4 \pm 3,0^{ab}$	$91,8 \pm 4,2^{ab}$
112	$0,051 \pm 0,005^{cd}$	$4,3 \pm 0,4^d$	$2,8 \pm 0,3^c$	$63,5 \pm 2,7^a$	$124,2 \pm 22,9^{ab}$
128	$0,049 \pm 0,008^d$	$4,1 \pm 0,6^d$	$2,5 \pm 0,4^c$	$61,6 \pm 2,2^{ab}$	$100,9 \pm 6,1^{ab}$
144	$0,064 \pm 0,007^{bcd}$	$5,4 \pm 0,6^{bcd}$	$2,8 \pm 0,2^c$	$51,2 \pm 2,7^b$	$73,3 \pm 13,8^b$

Tabla III.7. Porcentajes de crecimiento relativo del peso fresco del vástago y la raíz con respecto al control de plantas de altramuz y soja tratadas con dosis crecientes de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

Dosis de Cu (μM)	Altramuz		Soja	
	Vástago	Raíz	Vástago	Raíz
1,6	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
16	86,3 \pm 2,8 ^b	94,9 \pm 3,7 ^a	80,4 \pm 2,9 ^b	76,7 \pm 3,9 ^b
32	72,3 \pm 1,6 ^c	48,4 \pm 1,4 ^b	46,1 \pm 0,9 ^c	60,7 \pm 0,5 ^c
48	55,3 \pm 1,6 ^d	45,0 \pm 0,7 ^{bc}	36,5 \pm 2,1 ^{de}	56,7 \pm 3,0 ^{cd}
64	55,2 \pm 2,6 ^d	36,6 \pm 0,6 ^{de}	30,6 \pm 1,9 ^{ef}	48,0 \pm 2,7 ^{de}
80	55,4 \pm 2,8 ^d	38,2 \pm 1,6 ^{cd}	37,0 \pm 1,4 ^d	48,5 \pm 2,6 ^{de}
96	46,8 \pm 2,1 ^e	38,7 \pm 0,7 ^{cd}	35,4 \pm 4,0 ^{de}	40,3 \pm 3,3 ^{ef}
112	44,3 \pm 3,5 ^e	34,1 \pm 1,1 ^{de}	28,4 \pm 1,6 ^f	37,5 \pm 2,6 ^{ef}
128	43,2 \pm 2,2 ^e	32,8 \pm 1,1 ^{de}	16,5 \pm 1,2 ^g	36,4 \pm 2,0 ^f
144	41,1 \pm 1,9 ^e	30,3 \pm 0,9 ^e	11,2 \pm 0,7 ^g	32,0 \pm 0,6 ^f

Tabla III.8. Absorción neta e índices de eficacia de Mn en plantas de altramuz y soja sometidas a diferentes dosis de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

Dosis de Cu (μM)	Absorción neta ($\mu\text{mol planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	Acumulación efectiva _{total} (%)	Acumulación efectiva _{vástago} (%)	Translocación (%)	[Mn] _{vástago} /[Mn] _{Raíz} (%)
<i>Altramuz</i>					
1,6	0,717 \pm 0,049 ^a	68,0 \pm 4,7 ^a	64,8 \pm 4,5 ^a	95,3 \pm 0,2 ^b	1341,5 \pm 67,6 ^a
32	0,360 \pm 0,028 ^b	34,2 \pm 2,7 ^c	31,3 \pm 2,6 ^b	91,5 \pm 0,5 ^{de}	796,9 \pm 43,4 ^{cd}
48	0,290 \pm 0,007 ^{bc}	27,5 \pm 0,7 ^{cd}	24,8 \pm 0,7 ^{bc}	90,3 \pm 0,3 ^e	704,9 \pm 29,7 ^d
64	0,264 \pm 0,026 ^{bc}	25,0 \pm 2,5 ^d	23,0 \pm 2,4 ^{bc}	91,6 \pm 0,7 ^{de}	733,0 \pm 64,6 ^d
80	0,288 \pm 0,033 ^{bc}	27,3 \pm 3,1 ^{cd}	25,2 \pm 3,0 ^{bc}	91,8 \pm 0,7 ^{de}	796,0 \pm 65,8 ^{cd}
96	0,259 \pm 0,022 ^{bc}	24,6 \pm 2,1 ^d	22,7 \pm 2,1 ^{bc}	92,0 \pm 0,8 ^{de}	915,9 \pm 106,1 ^{cd}
112	0,329 \pm 0,053 ^{bc}	26,6 \pm 1,9 ^{cd}	29,5 \pm 5,0 ^{bc}	94,0 \pm 0,8 ^{bc}	1163,3 \pm 111,6 ^{ab}
128	0,266 \pm 0,023 ^{bc}	25,3 \pm 2,1 ^{cd}	23,6 \pm 2,1 ^{bc}	93,3 \pm 0,6 ^{cd}	1025,1 \pm 101,8 ^{bc}
144	0,239 \pm 0,012 ^c	22,6 \pm 1,1 ^d	21,1 \pm 1,1 ^c	93,4 \pm 0,5 ^{cd}	1002,7 \pm 67,9 ^{bc}
<i>Soja</i>					
1,6	0,480 \pm 0,024 ^a	45,5 \pm 2,3 ^a	32,5 \pm 1,5 ^a	71,4 \pm 0,8 ^b	122,4 \pm 7,3 ^b
32	0,150 \pm 0,004 ^{bcd}	14,2 \pm 0,4 ^{bcd}	10,8 \pm 0,4 ^{bc}	76,0 \pm 1,7 ^{bcd}	225,7 \pm 12,2 ^{cd}
48	0,119 \pm 0,002 ^{de}	11,2 \pm 0,2 ^{de}	9,1 \pm 0,2 ^{cd}	81,0 \pm 0,5 ^{cde}	355,7 \pm 16,7 ^g
64	0,099 \pm 0,008 ^e	9,4 \pm 0,7 ^e	7,6 \pm 0,7 ^d	80,1 \pm 1,5 ^{cde}	335,9 \pm 11,4 ^{fg}
80	0,157 \pm 0,007 ^{bc}	14,9 \pm 0,7 ^{bc}	12,4 \pm 0,6 ^{bc}	83,3 \pm 0,9 ^e	303,1 \pm 8,8 ^{ef}
96	0,163 \pm 0,021 ^{bc}	15,5 \pm 2,0 ^{bc}	12,8 \pm 1,9 ^b	82,1 \pm 1,6 ^{de}	262,3 \pm 19,1 ^{de}
112	0,131 \pm 0,002 ^{cde}	12,4 \pm 0,2 ^{cde}	9,3 \pm 0,3 ^{cd}	74,7 \pm 1,8 ^{bc}	193,7 \pm 27,2 ^c
128	0,171 \pm 0,006 ^b	16,2 \pm 0,6 ^b	7,9 \pm 0,4 ^{cd}	47,3 \pm 1,7 ^a	52,5 \pm 4,5 ^a
144	0,152 \pm 0,004 ^{bcd}	14,4 \pm 0,4 ^{bcd}	7,3 \pm 0,6 ^d	48,7 \pm 4,8 ^a	56,7 \pm 5,3 ^a

Tabla III.9. Absorción neta e índices de eficacia de Zn en plantas de altramuzy soja sometidas a diferentes dosis de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Dosis de Cu (μM)	Absorción neta ($\mu\text{mol planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	Acumulación efectiva _{total} (%)	Acumulación efectiva _{vástago} (%)	Translocación (%)	$[\text{Zn}]_{\text{vástago}}/[\text{Zn}]_{\text{Raíz}}$ (%)
<i>Altramuz</i>					
1,6	$0,100 \pm 0,006^a$	$189,6 \pm 10,6^a$	$68,0 \pm 2,4^a$	$36,0 \pm 1,5^a$	$53,2 \pm 4,4^a$
32	$0,072 \pm 0,003^b$	$136,0 \pm 5,5^b$	$60,1 \pm 3,4^{ab}$	$44,2 \pm 1,0^b$	$69,6 \pm 2,6^b$
48	$0,059 \pm 0,002^c$	$111,1 \pm 4,0^c$	$52,2 \pm 3,3^{bc}$	$46,9 \pm 1,3^{bc}$	$98,7 \pm 5,6^c$
64	$0,053 \pm 0,001^{cd}$	$101,1 \pm 2,0^{cd}$	$51,1 \pm 3,1^{bc}$	$50,5 \pm 2,0^c$	$112,5 \pm 7,0^{cd}$
80	$0,053 \pm 0,002^{cd}$	$99,7 \pm 3,5^{cd}$	$51,4 \pm 2,0^{bc}$	$51,6 \pm 1,1^c$	$111,7 \pm 3,0^{cd}$
96	$0,048 \pm 0,001^{de}$	$91,4 \pm 2,0^{de}$	$46,0 \pm 2,0^c$	$50,3 \pm 1,2^c$	$124,4 \pm 3,9^{de}$
112	$0,052 \pm 0,003^{cd}$	$93,4 \pm 1,0^d$	$51,0 \pm 4,6^{bc}$	$51,6 \pm 2,0^c$	$131,5 \pm 2,6^e$
128	$0,047 \pm 0,002^{de}$	$89,1 \pm 3,4^{de}$	$45,8 \pm 2,5^c$	$51,4 \pm 1,2^c$	$118,6 \pm 5,8^{de}$
144	$0,041 \pm 0,002^e$	$77,4 \pm 3,5^e$	$45,1 \pm 2,9^c$	$58,1 \pm 1,6^d$	$150,6 \pm 3,6^f$
<i>Soja</i>					
1,6	$0,085 \pm 0,006^b$	$161,4 \pm 11,5^a$	$102,9 \pm 4,6^a$	$64,1 \pm 1,9^a$	$96,5 \pm 11,7^{ab}$
32	$0,041 \pm 0,001^c$	$77,7 \pm 1,5^b$	$45,6 \pm 1,2^b$	$58,6 \pm 0,5^b$	$104,3 \pm 4,4^a$
48	$0,037 \pm 0,001^{cd}$	$70,2 \pm 1,8^{bc}$	$37,4 \pm 1,1^{bc}$	$53,3 \pm 0,8^{cd}$	$98,1 \pm 1,9^{ab}$
64	$0,033 \pm 0,002^{cd}$	$61,8 \pm 3,6^{bc}$	$35,2 \pm 3,2^{cd}$	$56,7 \pm 2,3^{bc}$	$110,6 \pm 3,2^a$
80	$0,037 \pm 0,001^{cd}$	$70,0 \pm 2,1^{bc}$	$37,7 \pm 1,8^{bc}$	$53,8 \pm 1,0^{bcd}$	$75,5 \pm 3,8^c$
96	$0,035 \pm 0,004^{cd}$	$67,1 \pm 6,8^{bc}$	$36,5 \pm 5,3^{bc}$	$54,0 \pm 2,5^{bcd}$	$70,6 \pm 1,7^c$
112	$0,031 \pm 0,001^d$	$59,4 \pm 2,6^c$	$30,5 \pm 2,0^{cd}$	$51,4 \pm 1,1^d$	$71,0 \pm 5,9^c$
128	$0,037 \pm 0,002^{cd}$	$70,9 \pm 3,3^{bc}$	$29,3 \pm 1,0^{cd}$	$41,4 \pm 0,6^e$	$42,9 \pm 0,7^d$
144	$0,033 \pm 0,002^{cd}$	$62,3 \pm 3,7^{bc}$	$25,8 \pm 1,8^d$	$41,4 \pm 1,9^e$	$45,9 \pm 1,4^d$

Tabla III.10. Contenido de MDA (nmol g⁻¹ MF), -SH totales (nmol g⁻¹ MF) en plantas de altramuz y soja sometidas a diferentes dosis de Cu. Los datos son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

		Dosis de Cu (μ M)								
		1,6	32	48	64	80	96	112	128	144
		<i>Altramuz</i>								
Hojas	MDA	46,81 \pm 2,12 ^a	92,43 \pm 2,29 ^b	85,69 \pm 1,18 ^b	84,46 \pm 2,41 ^b	108,96 \pm 1,43 ^c	113,86 \pm 1,85 ^c	109,14 \pm 4,70 ^c	124,96 \pm 5,99 ^d	145,88 \pm 0,82 ^e
	-SH	570,24 \pm 16,87 ^a	814,57 \pm 14,14 ^b	999,75 \pm 38,18 ^c	1225,34 \pm 19,03 ^d	1329,51 \pm 21,20 ^e	1653,02 \pm 16,12 ^g	1362,89 \pm 35,40 ^e	1319,61 \pm 49,33 ^e	1502,85 \pm 2 4,00 ^e
Raíz	MDA	49,60 \pm 2,66 ^a	79,58 \pm 1,61 ^c	67,90 \pm 0,81 ^b	84,01 \pm 1,06 ^c	80,06 \pm 2,70 ^c	81,22 \pm 2,30 ^c	83,89 \pm 1,17 ^c	84,79 \pm 1,79 ^c	77,40 \pm 2,95 ^c
	-SH	66,22 \pm 3,14 ^a	205,26 \pm 4,67 ^b	195,57 \pm 2,41 ^b	203,31 \pm 4,13 ^b	193,75 \pm 4,59 ^b	236,29 \pm 9,20 ^c	198,45 \pm 10,42 ^b	235,69 \pm 15,52 ^c	251,15 \pm 4,64 ^c
		<i>Soja</i>								
Hojas	MDA	57,76 \pm 2,63 ^a	91,47 \pm 0,92 ^c	94,94 \pm 0,38 ^c	93,41 \pm 0,56 ^c	93,85 \pm 0,75 ^c	91,95 \pm 0,78 ^c	91,03 \pm 0,78 ^c	86,66 \pm 1,55 ^b	85,50 \pm 2,54 ^b
	-SH	761,76 \pm 6,64 ^a	926,05 \pm 32,37 ^{cd}	805,96 \pm 18,96 ^{ab}	850,22 \pm 18,25 ^{bc}	923,22 \pm 30,68 ^{cd}	1017,70 \pm 30,98 ^{de}	952,66 \pm 22,90 ^{de}	1141,17 \pm 44,44 ^f	1376,90 \pm 4,72 ^g
Raíz	MDA	41,93 \pm 2,05 ^b	49,33 \pm 2,96 ^{ab}	47,65 \pm 0,89 ^{ab}	44,66 \pm 0,94 ^{ab}	32,45 \pm 2,63 ^c	27,62 \pm 1,12 ^{cd}	23,09 \pm 1,55 ^{de}	19,96 \pm 2,15 ^{ef}	15,40 \pm 1,77 ^f
	-SH	193,63 \pm 1,92 ^a	207,66 \pm 2,79 ^b	259,85 \pm 14,91 ^{bc}	261,12 \pm 10,36 ^{bc}	280,53 \pm 4,46 ^c	266,30 \pm 7,95 ^{bc}	242,97 \pm 15,92 ^b	243,52 \pm 6,92 ^b	245,86 \pm 6,18 ^b

Capítulo IV. Alteraciones morfológicas, estructurales y fisiológicas producidas por el exceso de Cu en plantas de altramuz y soja

Tabla IV. 1. Índices de desarrollo foliar de plantas de altramuz y soja tratadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Parámetros foliares	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	24	1,6	24
	<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
LA (cm^2)	1003,3 \pm 25,1 ^a	325,9 \pm 15,4 ^b	1285,0 \pm 83,1 ^a	468,7 \pm 32,4 ^b
Nº hojas	34,76 \pm 0,28 ^a	12,69 \pm 0,80 ^b	24,50 \pm 0,75 ^a	17,42 \pm 0,85 ^b
LAR ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1} \text{MS total}$)	20,37 \pm 0,69 ^a	18,26 \pm 0,81 ^a	10,16 \pm 0,32 ^a	10,47 \pm 0,69 ^a
LT (kg MF hoja m^{-2})	0,207 \pm 0,002 ^a	0,110 \pm 0,009 ^b	0,266 \pm 0,014 ^a	0,284 \pm 0,024 ^a
LMR ($\text{g MS hoja g}^{-1} \text{MS planta}$)	0,44 \pm 0,01 ^a	0,28 \pm 0,01 ^b	0,47 \pm 0,00 ^a	0,43 \pm 0,01 ^b
SLA ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1} \text{MS}$)	46,18 \pm 1,20 ^a	64,74 \pm 3,44 ^b	21,64 \pm 0,68 ^a	24,45 \pm 2,16 ^a

Tabla IV.2. Índices fisiológicos en plantas de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Índices fisiológicos	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	24	1,6	24
	<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
NAR ($\text{g m}^{-2} \text{día}^{-1}$)	2,90 \pm 0,15 ^a	2,12 \pm 0,64 ^b	5,53 \pm 0,33 ^a	3,16 \pm 0,11 ^b
ICF	458,4 \pm 41,1 ^a	294,1 \pm 22,6 ^b	2379,0 \pm 79,1 ^a	538,2 \pm 88,0 ^b
Área verde (%)	91,59 \pm 0,42 ^a	90,08 \pm 1,36 ^a	95,77 \pm 0,63 ^a	68,3 \pm 1,72 ^b
Área amarilla (%)	0,18 \pm 0,01 ^a	1,86 \pm 0,20 ^b	0,02 \pm 0,00 ^a	0,22 \pm 0,03 ^b
Área roja (%)	8,23 \pm 0,42 ^a	8,06 \pm 0,55 ^a	4,20 \pm 0,63 ^a	31,48 \pm 1,84 ^b
Clorofila a ($\text{mg g}^{-1} \text{MF}$)	1,14 \pm 0,04 ^a	1,22 \pm 0,04 ^a	1,58 \pm 0,04 ^a	0,73 \pm 0,03 ^b
Clorofila b ($\text{mg g}^{-1} \text{MF}$)	0,28 \pm 0,01 ^a	0,33 \pm 0,01 ^b	0,42 \pm 0,01 ^a	0,20 \pm 0,01 ^b
Carotenoides totales ($\text{mg g}^{-1} \text{MF}$)	0,165 \pm 0,003 ^a	0,162 \pm 0,004 ^a	0,130 \pm 0,001 ^a	0,103 \pm 0,002 ^b

Tabla IV.3. Índices de desarrollo radicular de plantas de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Parámetros radiculares	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	24	1,6	24
	<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
Longitud (cm planta^{-1})	92,50 \pm 2,84 ^a	88,75 \pm 4,21 ^a	51,00 \pm 0,91 ^a	71,00 \pm 2,48 ^b
Radio (cm)	0,221 \pm 0,005 ^a	0,163 \pm 0,004 ^b	0,434 \pm 0,011 ^a	0,213 \pm 0,007 ^b
Área ($\text{cm}^2 \text{planta}^{-1}$)	28,40 \pm 3,32 ^a	90,43 \pm 3,20 ^b	138,93 \pm 3,15 ^a	94,51 \pm 0,56 ^b
RMR ($\text{g MS raíz g}^{-1} \text{MS planta}$)	0,316 \pm 0,013 ^a	0,495 \pm 0,017 ^b	0,206 \pm 0,004 ^a	0,231 \pm 0,011 ^a

Capítulo V. Fraccionamiento y localización subcelular de Cu en plantas de altramuz y soja

Tabla V.1. Concentración de Cu (nmol g⁻¹ MF) en pared celular, fracción soluble y orgánulos de HS, HI y raíces de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 µM de Cu. Los resultados son las medias ± E.T. (n = 4). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA (P < 0,05)

Fracciones	Órganos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
Pared	HS	9,13 ± 0,48 ^a	44,90 ± 1,23 ^b	8,99 ± 0,86 ^a	46,78 ± 1,61 ^b
	HI	6,94 ± 0,53 ^a	36,99 ± 2,04 ^b	11,50 ± 0,72 ^a	41,70 ± 2,13 ^b
	Raíz	29,65 ± 1,70 ^a	866,52 ± 8,54 ^b	22,77 ± 0,57 ^a	933,55 ± 62,77 ^b
Soluble	HS	6,35 ± 0,44 ^a	97,92 ± 4,26 ^b	7,63 ± 0,41 ^a	51,68 ± 2,47 ^b
	HI	5,37 ± 0,19 ^a	76,11 ± 4,91 ^b	11,89 ± 1,75 ^a	72,34 ± 0,09 ^b
	Raíz	7,10 ± 0,92 ^a	211,71 ± 3,90 ^b	8,95 ± 0,36 ^a	153,04 ± 10,57 ^b
Orgánulos	HS	11,40 ± 1,15 ^a	30,41 ± 0,21 ^b	1,04 ± 0,13 ^a	12,70 ± 0,59 ^b
	HI	6,62 ± 0,70 ^a	24,33 ± 1,02 ^b	2,30 ± 0,04 ^a	13,87 ± 0,25 ^b
	Raíz	4,78 ± 0,38 ^a	226,31 ± 3,13 ^b	2,00 ± 0,04 ^a	155,22 ± 16,27 ^b

Tabla V.2. Concentración de Fe (nmol g⁻¹ MF) en pared celular, fracción soluble y orgánulos de HS, HI y raíces de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 µM de Cu. Los resultados son las medias ± E.T. (n = 4). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA (P < 0,05)

Fracciones	Órganos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
Pared	HS	66,77 ± 5,38 ^a	64,11 ± 0,94 ^a	145,03 ± 7,41 ^a	44,41 ± 1,70 ^b
	HI	73,30 ± 1,97 ^a	64,53 ± 2,56 ^a	100,80 ± 4,94 ^a	56,48 ± 5,51 ^b
	Raíz	3155,7 ± 127,5 ^a	3819,0 ± 107,7 ^b	253,11 ± 15,95 ^a	2169,5 ± 37,6 ^b
Soluble	HS	45,81 ± 1,86 ^a	29,21 ± 3,44 ^b	53,02 ± 1,48 ^a	17,71 ± 1,08 ^b
	HI	60,63 ± 4,63 ^a	32,43 ± 6,49 ^b	44,55 ± 0,89 ^a	32,01 ± 1,88 ^b
	Raíz	96,82 ± 1,89 ^a	56,58 ± 1,31 ^b	24,77 ± 0,56 ^a	85,09 ± 2,29 ^b
Orgánulos	HS	178,84 ± 2,04 ^a	125,74 ± 2,63 ^b	74,72 ± 1,29 ^a	33,16 ± 1,11 ^b
	HI	130,48 ± 8,04 ^a	95,75 ± 8,54 ^b	125,45 ± 1,22 ^a	79,62 ± 6,95 ^b
	Raíz	1210,0 ± 91,7 ^a	1939,0 ± 17,3 ^b	113,22 ± 3,49 ^a	1629,6 ± 93,8 ^b

Tabla V.3. Concentración de Mn (nmol g⁻¹ MF) en pared celular, fracción soluble y orgánulos de HS, HI y raíces de altramuza y soja cultivadas con 1,6 y 24 µM de Cu. Los resultados son las medias ± E.T. (n = 4). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA (P < 0,05)

Fracciones	Órganos	Dosis Cu (µM)			
		1,6	24	1,6	24
		<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
Pared	HS	2311,6 ± 68,8 ^a	2846,0 ± 36,6 ^b	647,84 ± 54,35 ^a	2454,5 ± 57,4 ^b
	HI	3127,9 ± 131,0 ^a	2749,9 ± 120,3 ^a	1799,9 ± 21,2 ^a	3260,8 ± 18,4 ^b
	Raíz	135,58 ± 9,54 ^a	215,07 ± 4,52 ^b	99,93 ± 3,52 ^a	770,63 ± 26,36 ^b
Soluble	HS	1008,9 ± 36,5 ^a	1468,2 ± 58,1 ^b	209,60 ± 15,94 ^a	501,62 ± 25,08 ^b
	HI	1192,7 ± 69,1 ^a	1823,4 ± 69,5 ^b	277,38 ± 13,24 ^a	352,95 ± 2,75 ^a
	Raíz	89,86 ± 4,25 ^a	85,30 ± 0,75 ^a	43,64 ± 12,33 ^a	215,28 ± 15,55 ^b
Orgánulos	HS	4376,3 ± 65,0 ^a	3697,9 ± 65,6 ^b	187,24 ± 5,37 ^a	417,18 ± 21,25 ^b
	HI	4382,5 ± 196,4 ^a	3999,8 ± 73,0 ^a	523,51 ± 24,27 ^a	830,76 ± 26,37 ^b
	Raíz	82,26 ± 2,68 ^a	178,08 ± 5,91 ^b	76,29 ± 12,17 ^a	480,68 ± 3,92 ^b

Tabla V.4. Concentración de Zn (nmol g⁻¹ MF) en pared celular, fracción soluble y orgánulos de HS, HI y raíces de altramuza y soja cultivadas con 1,6 y 24 µM de Cu. Los resultados son las medias ± E.T. (n = 4). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA (P < 0,05)

Fracciones	Órganos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
Pared	HS	70,40 ± 2,95 ^a	78,10 ± 3,73 ^a	88,75 ± 6,33 ^a	93,40 ± 2,99 ^a
	HI	72,65 ± 2,20 ^a	54,92 ± 2,51 ^b	166,89 ± 9,17 ^a	233,13 ± 3,93 ^b
	Raíz	402,22 ± 22,17 ^a	261,56 ± 38,47 ^b	38,68 ± 2,17 ^a	126,96 ± 2,17 ^b
Soluble	HS	81,16 ± 4,73 ^a	130,97 ± 5,26 ^b	91,25 ± 2,41 ^a	154,66 ± 2,75 ^b
	HI	32,66 ± 1,60 ^a	45,11 ± 3,84 ^b	92,46 ± 3,48 ^a	147,94 ± 11,39 ^b
	Raíz	215,10 ± 3,09 ^a	29,03 ± 0,49 ^b	37,26 ± 3,82 ^a	10,42 ± 0,83 ^b
Orgánulos	HS	119,81 ± 2,97 ^a	75,75 ± 3,14 ^b	34,52 ± 0,46 ^a	43,83 ± 2,07 ^b
	HI	91,95 ± 2,64 ^a	62,96 ± 0,26 ^b	105,35 ± 4,08 ^a	105,76 ± 8,59 ^a
	Raíz	115,16 ± 6,46 ^a	153,73 ± 4,11 ^b	131,14 ± 1,28 ^a	110,82 ± 3,80 ^b

Tabla V.5. Concentración de K ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) en pared celular, fracción soluble y orgánulos de HS, HI y raíces de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Fracciones	Órganos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		Altramuz		Soja	
Pared	HS	58,15 ± 4,18 ^a	69,08 ± 1,68 ^a	129,32 ± 4,14 ^a	206,25 ± 3,10 ^b
	HI	47,22 ± 1,22 ^a	50,33 ± 1,92 ^a	145,65 ± 6,03 ^a	162,61 ± 7,05 ^a
	Raíz	59,23 ± 1,23 ^a	64,87 ± 6,46 ^a	40,66 ± 0,86 ^a	63,08 ± 2,57 ^b
Soluble	HS	110,08 ± 6,50 ^a	110,46 ± 8,28 ^a	149,16 ± 5,25 ^a	251,74 ± 11,33 ^b
	HI	108,69 ± 5,11 ^a	95,99 ± 7,44 ^a	235,23 ± 20,41 ^a	268,78 ± 10,38 ^a
	Raíz	78,49 ± 3,46 ^a	56,13 ± 0,61 ^b	76,04 ± 6,57 ^a	81,39 ± 3,93 ^a
Orgánulos	HS	8,86 ± 2,34 ^a	nd	3,55 ± 0,67 ^a	19,58 ± 3,31 ^b
	HI	5,24 ± 1,44 ^a	2,23 ± 0,38 ^a	6,39 ± 1,04 ^a	6,63 ± 0,18 ^a
	Raíz	6,04 ± 0,43 ^a	18,57 ± 2,39 ^b	4,24 ± 0,81 ^a	5,21 ± 0,64 ^a
nd: no detectado					

nd: no detectado

Tabla V.6. Concentración de Ca ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) en pared celular, fracción soluble y orgánulos de HS, HI y raíces de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Fracciones	Órganos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		Altramuz		Soja	
Pared	HS	13,09 ± 0,98 ^a	16,69 ± 0,30 ^b	44,00 ± 3,84 ^a	58,29 ± 1,76 ^b
	HI	15,29 ± 0,67 ^a	15,35 ± 0,51 ^a	59,83 ± 3,12 ^a	65,69 ± 1,24 ^a
	Raíz	5,13 ± 0,07 ^a	6,40 ± 0,28 ^b	2,41 ± 0,03 ^a	5,49 ± 0,24 ^b
Soluble	HS	14,63 ± 0,43 ^a	16,30 ± 1,24 ^a	22,94 ± 1,93 ^a	42,84 ± 1,52 ^b
	HI	16,50 ± 0,56 ^a	19,48 ± 1,32 ^a	60,38 ± 3,79 ^a	56,51 ± 2,20 ^a
	Raíz	3,91 ± 0,24 ^a	3,67 ± 0,23 ^a	3,34 ± 0,07 ^a	3,70 ± 0,34 ^a
Orgánulos	HS	18,32 ± 0,39 ^a	12,88 ± 0,40 ^b	8,84 ± 0,71 ^a	13,82 ± 0,70 ^b
	HI	18,02 ± 1,40 ^a	12,64 ± 0,86 ^b	29,52 ± 2,17 ^a	36,99 ± 4,05 ^a
	Raíz	0,79 ± 0,07 ^a	1,75 ± 0,19 ^b	0,77 ± 0,12 ^a	1,63 ± 0,22 ^b

Tabla V.7. Concentración de Mg ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) en pared celular, fracción soluble y orgánulos de HS, HI y raíces de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Fracciones	Órganos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		<i>Altramuz</i>		<i>Soja</i>	
Pared	HS	6,28 ± 0,51 ^a	8,32 ± 0,18 ^a	13,69 ± 0,52 ^a	18,37 ± 0,72 ^b
	HI	5,85 ± 0,19 ^a	5,96 ± 0,47 ^a	13,74 ± 0,44 ^a	16,67 ± 0,24 ^b
	Raíz	4,58 ± 0,21 ^a	3,12 ± 0,07 ^b	5,57 ± 0,22 ^a	5,99 ± 0,29 ^a
Soluble	HS	9,70 ± 0,40 ^a	11,23 ± 0,86 ^a	12,17 ± 0,19 ^a	18,91 ± 0,65 ^b
	HI	11,19 ± 0,85 ^a	10,01 ± 0,37 ^a	18,56 ± 0,47 ^a	22,89 ± 0,58 ^b
	Raíz	3,32 ± 0,27 ^a	1,23 ± 0,04 ^b	8,10 ± 0,48 ^a	3,86 ± 0,15 ^b
Orgánulos	HS	8,47 ± 0,86 ^a	7,34 ± 0,04 ^a	4,19 ± 0,15 ^a	4,94 ± 0,41 ^a
	HI	6,99 ± 0,35 ^a	5,44 ± 0,17 ^a	7,46 ± 0,36 ^a	8,42 ± 1,07 ^a
	Raíz	1,13 ± 0,04 ^a	1,19 ± 0,10 ^a	2,63 ± 0,05 ^a	1,84 ± 0,05 ^b

Tabla V.8. Localización de Cu (% señal) en secciones de hojas y raíces de altramuzy y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Órganos	Tejidos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		Citoplasma-vacuola		Pared celular	
		Altramuz			
Hojas	Epidermis superior	4,20 ± 0,60 ^a	4,72 ± 0,64 ^a	3,06 ± 0,23 ^a	2,94 ± 0,17 ^a
	Parenq. empalizada	4,07 ± 0,56 ^a	4,42 ± 0,67 ^a	4,26 ± 0,48 ^a	3,98 ± 0,52 ^a
	Vasos internos	4,33 ± 0,11 ^a	4,54 ± 0,46 ^a	---	---
	Parénquima lagunar	2,96 ± 0,58 ^a	30,89 ± 1,64 ^b	4,46 ± 0,69 ^a	3,97 ± 0,50 ^a
	Epidermis inferior	5,13 ± 0,39 ^a	6,13 ± 0,57 ^a	15,12 ± 0,96 ^a	24,46 ± 0,72 ^b
Raíz	Rizodermis	---	---	---	---
	Córtex externo	0,33 ± 0,03 ^a	0,43 ± 0,02 ^b	---	---
	Córtex interno	0,25 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,02 ^a	---	---
	Cilindro central	0,26 ± 0,02 ^a	0,32 ± 0,03 ^a	---	---
		Soja			
Hojas	Epidermis superior	3,19 ± 0,17 ^a	3,04 ± 0,05 ^a	3,36 ± 0,16 ^a	2,59 ± 0,04 ^b
	Parenq. empalizada	4,30 ± 0,36 ^a	3,08 ± 0,11 ^b	2,67 ± 0,10 ^a	4,33 ± 0,09 ^b
	Vasos internos	3,23 ± 0,43 ^a	2,82 ± 0,16 ^a		
	Parénquima lagunar	2,91 ± 0,44 ^a	2,60 ± 0,33 ^a	3,39 ± 0,24 ^a	3,84 ± 0,22 ^a
	Epidermis inferior	3,80 ± 0,18 ^a	5,17 ± 0,32 ^b	4,20 ± 0,31 ^a	15,70 ± 0,87 ^b
Raíz	Rizodermis	1,72 ± 0,15 ^a	3,04 ± 0,15 ^b	---	---
	Córtex externo	2,53 ± 0,10 ^a	2,31 ± 0,13 ^a	---	---
	Córtex interno	1,45 ± 0,12 ^a	2,54 ± 0,10 ^b	---	---
	Cilindro central	nd	1,55 ± 0,07	---	---

nd: no detectado

Tabla V.9. Localización de Fe (% señal) en secciones de hojas y raíces de altramuza y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Órganos	Tejidos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		Citoplasma-vacuola		Pared celular	
Altramuz					
Hojas	Epidermis superior	1,56 ± 0,23 ^a	1,99 ± 0,26 ^a	1,71 ± 0,18 ^a	1,73 ± 0,14 ^a
	Parenq. empalizada	1,66 ± 0,12 ^a	3,29 ± 0,17 ^b	1,38 ± 0,08 ^a	1,67 ± 0,20 ^a
	Vasos internos	0,97 ± 0,05 ^a	7,81 ± 0,86 ^b	---	---
	Parénquima lagunar	1,00 ± 0,14 ^a	7,96 ± 0,16 ^b	2,63 ± 0,25 ^a	2,03 ± 0,21 ^a
	Epidermis inferior	1,25 ± 0,09 ^a	1,65 ± 0,16 ^a	1,46 ± 0,14 ^a	2,84 ± 0,11 ^b
Raíz	Rizodermis	nd	nd	nd	nd
	Córtex externo	nd	nd	nd	nd
	Córtex interno	nd	nd	nd	nd
	Cilindro central	nd	nd	nd	nd
Soja					
Hojas	Epidermis superior	1,72 ± 0,14 ^a	1,70 ± 0,02 ^a	1,82 ± 0,14 ^a	0,98 ± 0,06 ^b
	Parenq. empalizada	1,63 ± 0,17 ^a	1,09 ± 0,06 ^b	2,14 ± 0,18 ^a	1,56 ± 0,02 ^b
	Vasos internos	1,22 ± 0,03 ^a	1,39 ± 0,04 ^a	---	---
	Parénquima lagunar	1,47 ± 0,16 ^a	1,21 ± 0,12 ^a	1,48 ± 0,08 ^a	1,32 ± 0,16 ^a
	Epidermis inferior	1,55 ± 0,05 ^a	1,23 ± 0,05 ^b	1,94 ± 0,04 ^a	1,44 ± 0,15 ^b
Raíz	Rizodermis	nd	nd	nd	nd
	Córtex externo	nd	nd	nd	nd
	Córtex interno	nd	nd	nd	nd
	Cilindro central	nd	nd	nd	nd

Tabla V.10. Localización de Zn (% señal) en secciones de hojas y raíces de altramuza y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Órganos	Tejidos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		Citoplasma-vacuola		Pared celular	
		Altramuz			
Hojas	Epidermis superior	nd	2,05 ± 0,17	1,65 ± 0,08 ^a	1,91 ± 0,20 ^a
	Parenq. empalizada	nd	2,31 ± 0,40	1,41 ± 0,03 ^a	2,53 ± 0,29 ^b
	Vasos internos	nd	nd	---	---
	Parénquima lagunar	1,73 ± 0,11 ^a	22,11 ± 0,81 ^b	1,73 ± 0,08 ^a	2,83 ± 0,32 ^b
	Epidermis inferior	4,18 ± 0,23 ^a	3,15 ± 0,29 ^b	8,23 ± 0,42 ^a	9,71 ± 0,96 ^a
Raíz	Rizodermis	nd	nd	nd	nd
	Córtex externo	nd	nd	nd	nd
	Córtex interno	nd	nd	nd	nd
	Cilindro central	nd	nd	nd	nd
		Soja			
Hojas	Epidermis superior	nd	nd	nd	nd
	Parenq. empalizada	nd	1,95 ± 0,16	nd	nd
	Vasos internos	nd	nd	---	---
	Parénquima lagunar	nd	2,03 ± 0,01	nd	2,20 ± 0,17
	Epidermis inferior	2,35 ± 0,19 ^a	4,41 ± 0,26 ^b	nd	9,37 ± 0,39
Raíz	Rizodermis	nd	nd	nd	nd
	Córtex externo	nd	nd	nd	nd
	Córtex interno	nd	nd	nd	nd
	Cilindro central	nd	nd	nd	nd
nd: no detectado					

nd: no detectado

Tabla V.11. Localización de Ni (% señal) en secciones de hojas y raíces de altramuzy y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Órganos	Tejidos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		Citoplasma-vacuola		Pared celular	
		Altramuz			
Hojas	Epidermis superior	2,14 ± 0,25 ^a	2,72 ± 0,16 ^a	2,13 ± 0,23 ^a	2,00 ± 0,09 ^a
	Parenq. empalizada	2,55 ± 0,25 ^a	3,17 ± 0,20 ^a	2,24 ± 0,24 ^a	2,32 ± 0,29 ^a
	Vasos internos	3,84 ± 0,31 ^a	2,17 ± 0,16 ^b	---	---
	Parénquima lagunar	1,54 ± 0,05 ^a	14,52 ± 0,90 ^b	2,10 ± 0,15 ^a	1,99 ± 0,10 ^a
	Epidermis inferior	1,49 ± 0,18 ^a	2,26 ± 0,16 ^b	1,71 ± 0,14 ^a	3,89 ± 0,28 ^b
Raíz	Rizodermis	nd	nd	nd	nd
	Córtex externo	nd	nd	nd	nd
	Córtex interno	nd	nd	nd	nd
	Cilindro central	nd	nd	nd	nd
		Soja			
Hojas	Epidermis superior	3,13 ± 0,33 ^a	2,54 ± 0,28 ^a	4,53 ± 0,45	nd
	Parenq. empalizada	2,51 ± 0,25 ^a	1,92 ± 0,22 ^a	5,56 ± 0,48	nd
	Vasos internos	1,61 ± 0,29 ^a	2,01 ± 0,10 ^a	---	---
	Parénquima lagunar	5,44 ± 0,54 ^a	1,45 ± 0,05 ^b	1,28 ± 0,02 ^a	1,70 ± 0,17 ^a
	Epidermis inferior	2,19 ± 0,27 ^a	1,25 ± 0,16 ^b	2,07 ± 0,30 ^a	1,19 ± 0,20 ^b
Raíz	Rizodermis	nd	nd	nd	nd
	Córtex externo	nd	nd	nd	nd
	Córtex interno	nd	nd	nd	nd
	Cilindro central	nd	nd	nd	nd

nd: no detectado

Tabla V.12. Localización de P (% señal) en secciones de hojas y raíces de altramuzy y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Órganos	Tejidos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		Citoplasma-vacuola		Pared celular	
		Altramuz			
Hojas	Epidermis superior	4,84 ± 0,13 ^a	3,02 ± 0,17 ^b	3,37 ± 0,23 ^a	2,02 ± 0,10 ^b
	Parenq. empalizada	1,98 ± 0,21 ^a	1,85 ± 0,13 ^a	2,41 ± 0,28 ^a	2,06 ± 0,09 ^a
	Vasos internos	2,73 ± 0,08 ^a	2,43 ± 0,07 ^b	---	---
	Parénquima lagunar	3,47 ± 0,25	nd	2,60 ± 0,17 ^a	2,60 ± 0,17 ^a
	Epidermis inferior	5,24 ± 0,17 ^a	3,24 ± 0,24 ^b	2,36 ± 0,18 ^a	1,48 ± 0,10 ^b
Raíz	Rizodermis				
	Córtex externo	0,40 ± 0,04 ^a	0,63 ± 0,03 ^b	---	---
	Córtex interno	0,27 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	---	---
	Cilindro central	0,22 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,02 ^a	---	---
		Soja			
Hojas	Epidermis superior	2,50 ± 0,13 ^a	2,52 ± 0,12 ^a	2,82 ± 0,10 ^a	2,54 ± 0,05 ^b
	Parenq. empalizada	3,00 ± 0,13 ^a	2,50 ± 0,12 ^b	2,84 ± 0,08 ^a	2,30 ± 0,14 ^b
	Vasos internos	2,93 ± 0,20 ^a	2,84 ± 0,09 ^a		
	Parénquima lagunar	3,09 ± 0,13 ^a	3,13 ± 0,23 ^a	2,59 ± 0,11 ^a	2,53 ± 0,12 ^a
	Epidermis inferior	3,67 ± 0,17 ^a	3,96 ± 0,22 ^a	3,01 ± 0,16 ^a	2,07 ± 0,06 ^b
Raíz	Rizodermis	1,86 ± 0,15 ^a	2,58 ± 0,23 ^b	---	---
	Córtex externo	1,94 ± 0,18 ^a	2,42 ± 0,10 ^a	---	---
	Córtex interno	2,07 ± 0,14 ^a	2,62 ± 0,07 ^b	---	---
	Cilindro central	2,99 ± 0,08 ^a	2,42 ± 0,08 ^b	---	---

nd: no detectado

Tabla V.13. Localización de K (% señal) en secciones de hojas y raíces de altramuzy y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Órganos	Tejidos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		Citoplasma-vacuola		Pared celular	
		Altramuz			
Hojas	Epidermis superior	4,89 ± 0,46 ^a	4,11 ± 0,20 ^a	2,58 ± 0,11 ^a	2,02 ± 0,13 ^b
	Parenq. empalizada	4,07 ± 0,31 ^a	2,87 ± 0,26 ^b	6,14 ± 0,03 ^a	2,47 ± 0,21 ^b
	Vasos internos	2,60 ± 0,17 ^a	1,54 ± 0,15 ^b	---	---
	Parénquima lagunar	2,89 ± 0,32	nd	2,27 ± 0,16 ^a	1,59 ± 0,12 ^b
	Epidermis inferior	4,17 ± 0,30 ^a	4,47 ± 0,26 ^a	1,06 ± 0,08	nd
Raíz	Rizodermis	---	---	---	---
	Córtex externo	1,01 ± 0,09 ^a	1,08 ± 0,16 ^a	---	---
	Córtex interno	0,53 ± 0,05 ^a	0,39 ± 0,02 ^b	---	---
	Cilindro central	0,31 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^b	---	---
		Soja			
Hojas	Epidermis superior	2,49 ± 0,13 ^a	1,49 ± 0,11 ^b	1,27 ± 0,08 ^a	1,23 ± 0,01 ^a
	Parenq. empalizada	3,12 ± 0,18 ^a	2,01 ± 0,09 ^b	2,29 ± 0,03 ^a	1,07 ± 0,05 ^b
	Vasos internos	2,74 ± 0,16 ^a	1,94 ± 0,05 ^b		
	Parénquima lagunar	4,98 ± 0,28 ^a	4,85 ± 0,14 ^a	1,80 ± 0,16 ^a	2,70 ± 0,09 ^b
	Epidermis inferior	2,54 ± 0,23 ^a	1,59 ± 0,05 ^b	0,94 ± 0,06	nd
Raíz	Rizodermis	1,04 ± 0,11	nd	---	---
	Córtex externo	4,53 ± 0,25 ^a	3,04 ± 0,31 ^b	---	---
	Córtex interno	2,24 ± 0,03 ^a	4,46 ± 0,22 ^b	---	---
	Cilindro central	3,77 ± 0,06 ^a	4,88 ± 0,25 ^b	---	---

nd: no detectado

Tabla V.14. Localización de Mg (% señal) en secciones de hojas y raíces de altramuz y soja cultivadas con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Entre dosis de Cu, la significación de las medias se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Órganos	Tejidos	Dosis Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	24
		Citoplasma-vacuola		Pared celular	
		Altramuz			
Hojas	Epidermis superior	4,03 ± 0,57 ^a	4,83 ± 0,79 ^a	4,52 ± 0,54 ^a	5,42 ± 0,48 ^a
	Parenq. empalizada	4,67 ± 0,53 ^a	2,80 ± 0,26 ^b	5,63 ± 0,41 ^a	3,81 ± 0,18 ^b
	Vasos internos	12,34 ± 0,77 ^a	8,76 ± 0,59 ^b	---	---
	Parénquima lagunar	10,34 ± 0,81	nd	2,67 ± 0,16 ^a	3,36 ± 0,22 ^b
	Epidermis inferior	7,25 ± 0,06 ^a	4,43 ± 0,17 ^b	3,04 ± 0,32 ^a	1,39 ± 0,07 ^b
Raíz	Rizodermis	---	---	---	---
	Córtex externo	5,74 ± 0,24 ^a	3,88 ± 0,40 ^b	---	---
	Córtex interno	1,26 ± 0,07 ^a	2,00 ± 0,25 ^b	---	---
	Cilindro central	1,82 ± 0,14 ^a	4,55 ± 0,33 ^b	---	---
		Soja			
Hojas	Epidermis superior	1,84 ± 0,11 ^a	1,79 ± 0,11 ^a	2,17± 0,19 ^a	3,41 ± 0,37 ^b
	Parenq. empalizada	3,40 ± 0,27 ^a	2,66 ± 0,29 ^a	6,29 ± 0,73 ^a	1,41 ± 0,16 ^b
	Vasos internos	3,50 ± 0,03 ^a	3,68 ± 0,31 ^a	---	---
	Parénquima lagunar	4,04 ± 0,13 ^a	4,18 ± 0,18 ^a	2,01 ± 0,21 ^a	1,88 ± 0,15 ^a
	Epidermis inferior	2,50 ± 0,04 ^a	3,69 ± 0,39 ^b	1,61 ± 0,02 ^a	0,88 ± 0,10 ^b
Raíz	Rizodermis	13,56 ± 0,33 ^a	10,14 ± 0,62 ^b	---	---
	Córtex externo	14,43 ± 0,37 ^a	12,48 ± 0,46 ^b	---	---
	Córtex interno	16,30 ± 0,47 ^a	10,00 ± 0,52 ^b	---	---
	Cilindro central	11,81 ± 0,31 ^a	14,47 ± 0,63 ^b	---	---

nd: no detectado

Capítulo VI. Efecto del Cu sobre el desarrollo y funcionamiento de plantas noduladas de altramuz y soja

Tabla VI.1. Porcentajes de Cu disponible y retenido por el sustrato. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias en una columna seguidas de la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Dosis de Cu (μM)	Cu (%)	
	Disponible	Retenido
1,6	99,9 \pm 1,8 ^a	0,1 \pm 0,0 ^a
48	82,4 \pm 0,7 ^b	17,6 \pm 0,7 ^b
96	75,6 \pm 0,9 ^c	24,44 \pm 0,9 ^c
192	70,91 \pm 0,7 ^d	29,09 \pm 0,7 ^d

Tabla VI.2. Efecto de la dosis de Cu sobre los pesos frescos de plantas noduladas de altramuz y soja (g MF planta⁻¹) tras 35 días de tratamiento. Los datos son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente de acuerdo con el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

	Dosis Cu (μ M)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Hojas	3,68 \pm 0,10 ^a	2,02 \pm 0,10 ^b	1,29 \pm 0,10 ^c	0,84 \pm 0,10 ^d
Tallos	2,01 \pm 0,11 ^a	1,69 \pm 0,05 ^b	1,03 \pm 0,08 ^c	0,82 \pm 0,08 ^d
Vástago	5,70 \pm 0,12 ^a	3,71 \pm 0,13 ^b	2,32 \pm 0,18 ^c	1,65 \pm 0,17 ^d
Raíz	1,63 \pm 0,03 ^{ab}	1,83 \pm 0,10 ^a	1,59 \pm 0,06 ^b	1,33 \pm 0,09 ^c
<i>Soja</i>				
Hojas	3,43 \pm 0,31 ^a	2,29 \pm 0,22 ^b	1,50 \pm 0,14 ^c	1,06 \pm 0,07 ^c
Tallos	2,14 \pm 0,14 ^a	1,32 \pm 0,08 ^b	0,90 \pm 0,07 ^c	0,66 \pm 0,05 ^c
Vástago	5,57 \pm 0,40 ^a	3,61 \pm 0,29 ^b	2,40 \pm 0,20 ^c	1,72 \pm 0,12 ^c
Raíz	1,47 \pm 0,06 ^a	1,90 \pm 0,14 ^b	1,39 \pm 0,14 ^a	1,45 \pm 0,15 ^a

Tabla VI.3. Concentración de Cu (mg kg⁻¹MS) en hojas, tallos, raíces y nódulos de plantas noduladas de altramuz y soja sometidas a dosis crecientes de Cu. Los datos son las medias \pm E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

	Dosis Cu (μ M)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Hojas	9,79 \pm 0,17 ^a	79,56 \pm 1,93 ^b	107,93 \pm 6,83 ^c	132,08 \pm 1,53 ^d
Tallos	6,11 \pm 0,06 ^a	26,46 \pm 0,87 ^b	33,65 \pm 0,48 ^c	38,35 \pm 0,43 ^d
Raíz	11,95 \pm 0,80 ^a	94,93 \pm 2,55 ^b	242,08 \pm 10,95 ^c	439,63 \pm 40,09 ^d
Nódulos	6,06 \pm 0,29 ^a	34,19 \pm 1,45 ^b	58,82 \pm 0,82 ^c	110,10 \pm 4,63 ^d
<i>Soja</i>				
Hojas	6,86 \pm 0,39 ^a	36,71 \pm 1,84 ^b	66,30 \pm 3,52 ^c	67,11 \pm 1,76 ^c
Tallos	5,31 \pm 0,29 ^a	24,19 \pm 0,47 ^b	35,44 \pm 2,41 ^c	40,08 \pm 1,68 ^d
Raíz	13,37 \pm 0,44 ^a	267,95 \pm 5,91 ^b	448,80 \pm 21,48 ^c	810,75 \pm 45,45 ^d
Nódulos	3,63 \pm 0,16 ^a	55,16 \pm 2,17 ^b	131,72 \pm 4,42 ^c	247,67 \pm 9,81 ^d

Tabla VI.4. Localización de Cu (% señal) en secciones de nódulos de altramuzy y soja cultivados con 1,6 y 24 μM de Cu. Los resultados son las medias \pm E.T. ($n = 3$). La significación de las medias para dosis de Cu y especie vegetal se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

	Dosis Cu (μM)			
Tejidos celulares	1,6	192	1,6	192
	Citoplasma-vacuola		Pared celular	
	Altramuz			
Córtex externo	5,09 ± 0,26 ^a	2,52 ± 0,09 ^b	6,17 ± 0,39 ^a	3,98 ± 0,23 ^b
Córtex medio	4,15 ± 0,28 ^a	1,66 ± 0,07 ^b	4,79 ± 0,19 ^a	2,67 ± 0,08 ^b
Córtex interno	3,54 ± 0,27 ^a	4,20 ± 0,07 ^b	5,31 ± 0,47 ^a	5,20 ± 0,29 ^a
Zona infectada	3,25 ± 0,05 ^a	3,26 ± 0,33 ^a	4,54 ± 0,16 ^a	6,16 ± 0,40 ^b
	Soja			
Córtex externo	nd	2,63 ± 0,31	nd	3,69 ± 0,57
Córtex medio	nd	3,71 ± 0,50	nd	3,15 ± 0,22
Córtex interno	nd	3,09 ± 0,34	nd	1,77 ± 0,09
Zona infectada	nd	3,52 ± 0,28	nd	nd

nd: no detectado

Tabla VI.5. Contenido de N (mmol planta^{-1}) en los distintos órganos de plantas noduladas de altramuzy y soja cultivadas durante 35 días con dosis crecientes de Cu (1,6-192 μM). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Dosis de Cu (μM)	Órganos			
	Hojas	Tallos	Vástago	Raíz
<i>Altramuz</i>				
1,6	1,38 \pm 0,04 ^a	0,32 \pm 0,03 ^{ab}	1,70 \pm 0,05 ^a	0,23 \pm 0,01 ^a
48	0,91 \pm 0,02 ^b	0,35 \pm 0,01 ^a	1,26 \pm 0,02 ^b	0,25 \pm 0,02 ^a
96	0,57 \pm 0,02 ^c	0,27 \pm 0,01 ^{bc}	0,84 \pm 0,02 ^c	0,26 \pm 0,02 ^a
192	0,30 \pm 0,02 ^d	0,23 \pm 0,01 ^c	0,53 \pm 0,02 ^d	0,23 \pm 0,02 ^a
<i>Soja</i>				
1,6	2,13 \pm 0,14 ^a	0,73 \pm 0,04 ^a	2,86 \pm 0,17 ^a	0,28 \pm 0,01 ^a
48	1,65 \pm 0,19 ^b	0,72 \pm 0,05 ^a	2,37 \pm 0,24 ^b	0,42 \pm 0,04 ^b
96	0,84 \pm 0,02 ^c	0,58 \pm 0,04 ^b	1,42 \pm 0,04 ^c	0,36 \pm 0,05 ^{ab}
192	0,69 \pm 0,04 ^c	0,41 \pm 0,01 ^c	1,10 \pm 0,04 ^c	0,37 \pm 0,01 ^{ab}

Tabla VI.6. Contenido de C (mmol planta⁻¹) en los distintos órganos de plantas noduladas de altramuz y soja cultivadas durante 35 días con dosis crecientes de Cu (1,6-192 µM). Los resultados son las medias ± el E.T. (n = 4). Medias dentro de una columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan (P < 0,05)

Dosis de Cu (µM)	Órganos			
	Hojas	Tallos	Vástago	Raíz
<i>Altramuz</i>				
1,6	12,49 ± 0,17 ^a	5,19 ± 0,29 ^a	17,67 ± 0,39 ^a	5,01 ± 0,22 ^a
48	9,06 ± 0,44 ^b	5,54 ± 0,20 ^a	14,60 ± 0,57 ^b	5,65 ± 0,25 ^a
96	6,00 ± 0,38 ^c	3,89 ± 0,26 ^b	9,89 ± 0,59 ^c	5,51 ± 0,22 ^a
192	2,75 ± 0,06 ^d	2,78 ± 0,04 ^c	5,53 ± 0,09 ^d	4,36 ± 0,12 ^b
<i>Soja</i>				
1,6	22,72 ± 0,88 ^a	13,20 ± 1,18 ^a	35,92 ± 2,63 ^a	5,38 ± 0,37 ^a
48	18,47 ± 2,20 ^b	11,54 ± 0,94 ^a	30,02 ± 3,10 ^a	7,56 ± 0,79 ^b
96	11,21 ± 0,17 ^c	7,66 ± 0,54 ^b	18,88 ± 0,71 ^b	6,26 ± 0,87 ^{ab}
192	9,19 ± 0,67 ^c	5,94 ± 0,50 ^b	15,13 ± 1,17 ^b	5,75 ± 0,27 ^{ab}

Tabla VI.7. Actividades enzimáticas del metabolismo del N (µmol NAD(P)H g⁻¹ MF min⁻¹) en nódulos de altramuz y soja sometidos durante 35 días con dosis crecientes de Cu (1,6-192 µM). Los resultados son las medias ± el E.T. (n = 4). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan (P < 0,05)

Enzimas	Dosis de Cu (µM)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Aspartato aminotransferasa (AAT)	6,72 ± 0,31 ^a	6,61 ± 0,67 ^a	4,43 ± 0,17 ^b	2,82 ± 0,25 ^c
Glutamato sintasa (GOGAT)	0,64 ± 0,02 ^b	0,81 ± 0,03 ^a	0,52 ± 0,02 ^c	0,43 ± 0,02 ^d
Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	2,12 ± 0,10 ^a	2,30 ± 0,03 ^a	2,14 ± 0,15 ^a	2,20 ± 0,09 ^a
Glutamina sintetasa (GS)	2,23 ± 0,15 ^a	2,64 ± 0,18 ^a	1,30 ± 0,10 ^b	1,00 ± 0,12 ^b
<i>Soja</i>				
Aspartato aminotransferasa (AAT)	13,47 ± 0,12 ^a	13,35 ± 0,24 ^a	13,85 ± 0,14 ^a	13,43 ± 0,26 ^a
Glutamato sintasa (GOGAT)	0,69 ± 0,02 ^a	0,77 ± 0,02 ^b	0,83 ± 0,02 ^c	0,72 ± 0,02 ^{ab}
Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	2,26 ± 0,10 ^a	2,66 ± 0,09 ^b	2,72 ± 0,02 ^b	2,65 ± 0,08 ^b
Glutamina sintetasa (GS)	7,66 ± 0,40 ^a	6,65 ± 0,18 ^b	6,04 ± 0,22 ^{bc}	5,69 ± 0,12 ^c

Tabla VI.8. Actividades enzimáticas del metabolismo del C ($\mu\text{mol NAD(P)H g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$) en nódulos de altramuz y soja sometidos durante 35 días con dosis crecientes de Cu (1,6-192 μM). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

Enzimas	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Sacarosa sintetasa (SS)	7,61 \pm 0,24 ^{ab}	9,31 \pm 0,27 ^c	8,44 \pm 0,41 ^{bc}	6,67 \pm 0,36 ^a
Malato deshidrogenasa (MDH)	135,7 \pm 6,4 ^b	161,2 \pm 7,7 ^a	125,0 \pm 3,1 ^{bc}	113,8 \pm 3,9 ^c
Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	0,97 \pm 0,05 ^a	1,65 \pm 0,12 ^b	1,14 \pm 0,11 ^a	1,11 \pm 0,13 ^a
UDPGlucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	23,69 \pm 0,93 ^{ab}	31,76 \pm 1,62 ^c	26,17 \pm 0,49 ^b	21,88 \pm 0,35 ^a
<i>Soja</i>				
Sacarosa sintetasa (SS)	9,01 \pm 0,21 ^a	9,17 \pm 0,25 ^a	8,60 \pm 0,21 ^a	7,13 \pm 0,38 ^b
Malato deshidrogenasa (MDH)	231,3 \pm 3,4 ^a	251,8 \pm 6,0 ^a	273,5 \pm 2,0 ^b	236,6 \pm 10,6 ^a
Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	1,61 \pm 0,10 ^a	1,69 \pm 0,05 ^{ab}	1,76 \pm 0,03 ^{ab}	1,84 \pm 0,02 ^b
UDPGlucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	28,88 \pm 1,33 ^a	27,57 \pm 1,39 ^a	26,58 \pm 0,21 ^a	22,78 \pm 0,73 ^b

Capítulo VII. Estudio comparativo entre fijación y no fijación de N₂: Respuestas de altramuz y soja frente al estrés por Cu

Tabla VII.1. Absorción neta, translocación y concentración de Cu en plantas de altramuz y soja con y sin FBN y cultivadas durante 35 días con 1,6 μM y exceso de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). La significación de las medias para dosis de Cu y especie vegetal con o sin FBN se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Índices de eficacia	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	24	1,6	48
	Sin FBN		Con FBN	
	Altramuz			
Absorción neta (μmol planta ⁻¹ día ⁻¹)	0,009 ± 0,000 ^a	0,131 ± 0,006 ^b	0,003 ± 0,000 ^a	0,019 ± 0,000 ^b
[Cu] vástago (mg kg ⁻¹ MS)	2,91 ± 0,13 ^a	29,34 ± 2,17 ^b	8,58 ± 0,12 ^a	57,70 ± 1,22 ^b
[Cu] raíz (mg kg ⁻¹ MS)	15,1 ± 0,57 ^a	443,9 ± 17,3 ^b	12,0 ± 0,8 ^a	94,9 ± 2,6 ^b
Translocación (%)	16,84 ± 0,98 ^a	2,70 ± 0,40 ^b	65,16 ± 0,85 ^a	56,06 ± 2,45 ^b
	Soja			
Absorción neta (μmol planta ⁻¹ día ⁻¹)	0,029 ± 0,003 ^a	0,264 ± 0,013 ^b	0,004 ± 0,000 ^a	0,043 ± 0,003 ^b
[Cu] vástago (mg kg ⁻¹ MS)	3,40 ± 0,26 ^a	12,57 ± 0,81 ^b	5,90 ± 0,15 ^a	33,85 ± 2,57 ^b
[Cu] raíz (mg kg ⁻¹ MS)	24,0 ± 1,8 ^a	758,1 ± 18,7 ^b	13,4 ± 0,4 ^a	268,0 ± 5,9 ^b
Translocación (%)	31,50 ± 2,74 ^a	4,16 ± 0,40 ^b	71,03 ± 0,71 ^a	30,77 ± 1,64 ^b

Tabla VII.2. Absorción neta, translocación y concentración de Cu en plantas noduladas de altramuz y soja cultivadas durante 35 días con dosis crecientes de Cu (1,6-192 μM). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

Índices de eficacia	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Absorción neta ($\mu\text{mol planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	0,003 \pm 0,000 ^a	0,019 \pm 0,000 ^b	0,029 \pm 0,001 ^c	0,036 \pm 0,003 ^d
Translocación (%)	65,16 \pm 0,85 ^a	56,06 \pm 2,45 ^b	33,52 \pm 1,31 ^c	18,39 \pm 1,50 ^d
<i>Soja</i>				
Absorción neta ($\mu\text{mol planta}^{-1}\text{día}^{-1}$)	0,004 \pm 0,000 ^a	0,043 \pm 0,003 ^b	0,043 \pm 0,004 ^b	0,064 \pm 0,006 ^c
Translocación (%)	71,03 \pm 0,71 ^a	30,77 \pm 1,64 ^b	27,66 \pm 2,70 ^b	15,22 \pm 0,58 ^c

Tabla VII.3. Tasas de crecimiento relativo (%) en vástago y raíz de plantas de altramuz y soja con y sin FBN, cultivadas durante 35 días con 1,6 μM y exceso de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). La significación de las medias para dosis de Cu y especie vegetal con o sin FBN se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Órgano de la planta	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	24	1,6	48
	Sin FBN		Con FBN	
	Altramuz			
Vástago	100,0 ^a	17,4 ± 1,5 ^b	100,0 ^a	65,1 ± 2,2 ^b
Raíz	100,0 ^a	51,7 ± 1,6 ^b	100,0 ^a	112,4 ± 6,4 ^a
	Soja			
Vástago	100,0 ^a	35,4 ± 1,4 ^b	100,0 ^a	64,8 ± 5,3 ^b
Raíz	100,0 ^a	33,3 ± 1,2 ^b	100,0 ^a	129,1 ± 9,6 ^b

Tabla VII.4. Tasas de crecimiento relativo (%) en vástago y raíz de plantas noduladas de altramuz y soja sometidas durante 35 días a dosis crecientes de Cu (1,6-192 μM). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

Órgano de la planta	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Vástago	100,0 ^a	65,1 \pm 2,2 ^b	40,7 \pm 3,2 ^c	29,0 \pm 3,0 ^d
Raíz	100,0 ^{ab}	112,4 \pm 6,4 ^a	97,2 \pm 3,7 ^b	81,7 \pm 5,4 ^c
<i>Soja</i>				
Vástago	100,0 ^a	64,8 \pm 5,3 ^b	43,1 \pm 3,6 ^c	30,9 \pm 2,1 ^d
Raíz	100,0 ^a	129,1 \pm 9,6 ^b	94,0 \pm 9,2 ^a	98,2 \pm 9,9 ^a

Tabla VII.5. Contenido de proteínas solubles (mg prot g⁻¹ MF) en hojas y raíces de plantas de altramuz y soja con y sin FBN, cultivadas durante 35 días con 1,6 µM y exceso de Cu. Los resultados son las medias ± el E.T. (n = 4). La significación de las medias para dosis de Cu y especie vegetal con y sin FBN se ha establecido a partir del ANOVA (P < 0,05)

Órgano de la planta	Dosis de Cu (μM)			
	1,6	24	1,6	48
	Sin FBN		Con FBN	
Altramuz				
Hojas	14,11 ± 0,87 ^a	9,79 ± 0,23 ^b	15,06 ± 1,44 ^a	36,32 ± 1,96 ^b
Raíz	4,49 ± 0,18 ^a	2,29 ± 0,30 ^b	3,34 ± 0,19 ^a	2,61 ± 0,20 ^b
Soja				
Hojas	29,80 ± 0,96 ^a	28,76 ± 1,10 ^a	25,03 ± 2,10 ^a	29,61 ± 1,61 ^a
Raíz	5,43 ± 0,29 ^a	5,19 ± 0,30 ^a	1,37 ± 0,20 ^a	3,12 ± 0,23 ^b

Tabla VII.6. Contenido de proteínas solubles (mg prot g⁻¹ MF) en hojas y raíces de plantas de altramuz y soja sometidas durante 35 días a dosis crecientes de Cu (1,6-192 µM). Los resultados son las medias ± el E.T. (n = 4). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan (P < 0,05)

Órgano de la planta	Dosis de Cu (µM)			
	1,6	48	96	192
<i>Altramuz</i>				
Hojas	15,06 ± 1,44 ^a	36,32 ± 1,96 ^c	33,38 ± 2,20 ^{bc}	29,38 ± 1,70 ^b
Raíz	3,34 ± 0,19 ^a	2,61 ± 0,20 ^b	3,17 ± 0,13 ^a	3,48 ± 0,06 ^a
<i>Soja</i>				
Hojas	25,03 ± 2,10 ^a	29,61 ± 1,61 ^a	28,36 ± 0,87 ^a	25,92 ± 2,37 ^a
Raíz	1,37 ± 0,20 ^a	3,12 ± 0,23 ^c	2,29 ± 0,10 ^b	2,25 ± 0,06 ^b

Tabla VII.7. Concentración de C y N (g kg^{-1}) en los distintos órganos de las plantas de altramuzy soja con y sin FBN, cultivadas durante 35 días con $1,6 \mu\text{M}$ y exceso de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). La significación de las medias para dosis de Cu y especie vegetal se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Elemento	Órgano	Dosis de Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	48
		Sin FBN		Con FBN	
		Altramuz			
C	Hojas	413,08 ± 3,48 ^a	408,02 ± 0,36 ^a	418,88 ± 3,66 ^a	443,23 ± 1,58 ^b
	Tallos	354,45 ± 11,56 ^a	393,75 ± 6,22 ^b	357,20 ± 1,88 ^a	387,09 ± 0,91 ^b
	Vástago	391,20 ± 4,32 ^a	413,04 ±11,05 ^a	398,67 ± 2,36 ^a	420,11 ± 0,96 ^b
	Raíz	385,45 ± 6,34 ^a	415,46 ± 2,10 ^b	384,93 ± 1,68 ^a	396,75 ± 1,14 ^b
N	Hojas	42,29 ± 0,64 ^a	25,77 ± 1,41 ^b	54,05 ± 1,78 ^a	52,09 ± 2,00 ^a
	Tallos	14,01 ± 0,44 ^a	9,38 ± 0,19 ^b	25,93 ± 1,01 ^a	28,33 ± 0,40 ^a
	Vástago	31,79 ± 0,59 ^a	19,02 ± 1,40 ^b	44,89 ± 1,23 ^a	42,28 ± 1,06 ^a
	Raíz	26,48 ± 0,63 ^a	23,32 ± 0,24 ^b	20,50 ± 0,45 ^a	20,81 ± 0,60 ^a
		Soja			
C	Hojas	413,87 ± 1,44 ^a	399,28 ± 2,67 ^b	423,27 ± 1,52 ^a	425,15 ± 1,35 ^a
	Tallos	407,55 ± 0,55 ^a	399,97 ± 3,04 ^b	401,53 ± 1,37 ^a	419,34 ± 1,98 ^b
	Vástago	437,82 ±18,09 ^a	408,91 ± 9,62 ^a	414,70 ± 1,15 ^a	422,81 ± 1,33 ^b
	Raíz	388,90 ± 1,05 ^a	407,45 ± 2,58 ^b	394,60 ± 2,13 ^a	407,11 ± 1,97 ^b
N	Hojas	49,20 ± 0,15 ^a	43,49 ± 0,60 ^b	46,18 ± 1,46 ^a	44,39 ± 1,24 ^a
	Tallos	23,53 ± 0,39 ^a	21,68 ± 0,57 ^b	24,47 ± 0,88 ^a	30,75 ± 0,29 ^b
	Vástago	37,58 ± 0,31 ^a	33,04 ± 0,38 ^b	37,61 ± 1,47 ^a	39,05 ± 0,73 ^a
	Raíz	42,01 ± 0,82 ^a	31,45 ± 1,39 ^b	21,89 ± 0,82 ^a	26,56 ± 0,45 ^b

Tabla VII.8. Concentración de C y N (g kg^{-1}) en las plantas noduladas de altramuz y soja cultivadas durante 35 días con dosis crecientes de Cu ($1,6\text{-}192 \mu\text{M}$). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Elemento	Órgano	Dosis de Cu (μM)			
		1,6	48	96	192
Altramuz					
C	Hojas	418,88 ± 3,66 ^a	443,23 ± 1,58 ^b	440,78 ± 1,27 ^b	443,92 ± 1,98 ^b
	Tallos	357,20 ± 1,88 ^a	387,09 ± 0,91 ^b	386,59 ± 1,75 ^b	385,72 ± 1,21 ^b
	Vástago	398,67 ± 2,36 ^a	420,11 ± 0,96 ^c	417,76 ± 0,60 ^c	412,79 ± 1,22 ^b
	Raíz	384,93 ± 1,68 ^a	396,75 ± 1,14 ^b	400,59 ± 2,56 ^b	407,78 ± 2,73 ^c
N	Hojas	54,05 ± 1,78 ^a	52,09 ± 2,00 ^a	50,48 ± 0,62 ^a	52,73 ± 0,87 ^a
	Tallos	25,93 ± 1,01 ^a	28,33 ± 0,40 ^a	31,67 ± 1,12 ^b	36,45 ± 1,43 ^c
	Vástago	44,89 ± 1,23 ^a	42,28 ± 1,06 ^a	42,89 ± 0,28 ^a	45,62 ± 1,28 ^a
	Raíz	20,50 ± 0,45 ^a	20,81 ± 0,60 ^a	21,74 ± 0,72 ^a	25,47 ± 0,87 ^b
Soja					
C	Hojas	423,27 ± 1,52 ^a	425,15 ± 1,35 ^a	422,20 ± 1,62 ^a	422,41 ± 4,13 ^a
	Tallos	401,53 ± 1,37 ^a	419,34 ± 1,98 ^b	414,55 ± 1,71 ^b	414,25 ± 2,16 ^b
	Vástago	414,70 ± 1,15 ^a	422,81 ± 1,33 ^b	419,07 ± 1,18 ^{ab}	419,11 ± 3,27 ^{ab}
	Raíz	394,60 ± 2,13 ^a	407,11 ± 1,97 ^b	416,11 ± 1,75 ^c	421,00 ± 4,19 ^c
N	Hojas	46,18 ± 1,46 ^a	44,39 ± 1,24 ^a	37,34 ± 0,38 ^b	37,63 ± 0,60 ^b
	Tallos	24,47 ± 0,88 ^a	30,75 ± 0,29 ^b	36,58 ± 1,25 ^c	35,18 ± 3,16 ^{bc}
	Vástago	37,61 ± 1,47 ^a	39,05 ± 0,73 ^a	36,15 ± 0,83 ^a	36,69 ± 1,61 ^a
	Raíz	21,89 ± 0,82 ^a	26,56 ± 0,45 ^b	27,99 ± 0,66 ^b	31,96 ± 1,07 ^c

Tabla VII. 9. Actividades enzimáticas del metabolismo del N ($\mu\text{mol NAD(P)H g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$) en hojas y raíces de altramuzy y soja con y sin FBN, cultivadas durante 35 días con 1,6 μM y exceso de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). La significación de las medias para dosis de Cu y especie vegetal con o sin FBN se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Órgano	Enzimas	Dosis de Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	48
		Sin FBN		Con FBN	
		Altramuz			
Hojas	Aspartato aminotransferasa (AAT)	2,42 ± 0,21 ^a	2,37 ± 0,05 ^a	3,15 ± 0,17 ^a	3,49 ± 0,12 ^a
	Glutamato sintasa (GOGAT)	0,18 ± 0,00 ^a	0,17 ± 0,00 ^b	0,29 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,01 ^a
	Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	1,02 ± 0,06 ^a	0,81 ± 0,02 ^b	1,59 ± 0,16 ^a	1,98 ± 0,12 ^a
	Glutamina sintetasa (GS)	2,26 ± 0,08 ^a	1,87 ± 0,13 ^b	0,42 ± 0,00 ^a	0,68 ± 0,06 ^b
Raíz	Aspartato aminotransferasa (AAT)	1,11 ± 0,05 ^a	0,95 ± 0,06 ^a	1,05 ± 0,02 ^a	0,80 ± 0,01 ^b
	Glutamato sintasa (GOGAT)	0,27 ± 0,00 ^a	0,26 ± 0,00 ^a	0,34 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,00 ^b
	Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	1,10 ± 0,04 ^a	0,60 ± 0,05 ^b	0,97 ± 0,05 ^a	0,73 ± 0,02 ^b
	Glutamina sintetasa (GS)	0,76 ± 0,04 ^a	0,03 ± 0,02 ^b	nd	nd
		Soja			
Hojas	Aspartato aminotransferasa (AAT)	6,30 ± 0,21 ^a	7,41 ± 0,08 ^b	4,77 ± 0,17 ^a	6,53 ± 0,35 ^b
	Glutamato sintasa (GOGAT)	0,29 ± 0,00 ^a	0,29 ± 0,00 ^a	0,27 ± 0,01 ^a	0,29 ± 0,00 ^a
	Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	2,25 ± 0,06 ^a	2,61 ± 0,12 ^b	1,59 ± 0,06 ^a	1,58 ± 0,06 ^a
	Glutamina sintetasa (GS)	8,59 ± 0,29 ^a	7,71 ± 0,13 ^b	1,84 ± 0,15 ^a	1,19 ± 0,03 ^b
Raíz	Aspartato aminotransferasa (AAT)	7,30 ± 0,28 ^a	7,46 ± 0,16 ^a	0,98 ± 0,09 ^a	1,70 ± 0,17 ^b
	Glutamato sintasa (GOGAT)	0,32 ± 0,00 ^a	0,30 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,00 ^a	0,26 ± 0,00 ^b
	Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	0,93 ± 0,05 ^a	0,66 ± 0,10 ^a	0,58 ± 0,06 ^a	1,07 ± 0,11 ^b
	Glutamina sintetasa (GS)	2,10 ± 0,13 ^a	1,75 ± 0,40 ^a	0,23 ± 0,02 ^a	0,43 ± 0,02 ^b
nd: no detectado					

nd: no detectado

Tabla VII.10. Actividades enzimáticas del metabolismo del N ($\mu\text{mol NAD(P)H g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$) en plantas noduladas de altramuz y soja cultivadas durante 35 días con dosis crecientes de Cu (1,6-192 μM). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el *test* de Duncan ($P < 0,05$)

Órgano		Enzimas	Dosis de Cu (μM)			
			1,6	48	96	192
Altramuz						
Hojas	Aspartato aminotransferasa (AAT)	3,15 ± 0,17 ^a	3,49 ± 0,12 ^b	3,31 ± 0,28 ^b	4,67 ± 0,29 ^b	
	Glutamato sintasa (GOGAT)	0,29 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,00 ^a	0,29 ± 0,00 ^a	
	Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	1,59 ± 0,16 ^a	1,98 ± 0,12 ^{ab}	2,04 ± 0,10 ^b	1,98 ± 0,10 ^{ab}	
	Glutamina sintetasa (GS)	0,42 ± 0,00 ^a	0,68 ± 0,06 ^b	0,54 ± 0,08 ^{ab}	0,47 ± 0,01 ^a	
Raíz	Aspartato aminotransferasa (AAT)	1,05 ± 0,02 ^a	0,80 ± 0,01 ^b	0,80 ± 0,01 ^b	1,01 ± 0,07 ^a	
	Glutamato sintasa (GOGAT)	0,34 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,00 ^b	0,36 ± 0,02 ^a	
	Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	0,97 ± 0,05 ^a	0,73 ± 0,02 ^b	0,81 ± 0,04 ^{ab}	1,19 ± 0,09 ^c	
	Glutamina sintetasa (GS)	nd	nd	nd	nd	
Soja						
Hojas	Aspartato aminotransferasa (AAT)	4,77 ± 0,17 ^a	6,53 ± 0,35 ^c	5,97 ± 0,15 ^{bc}	5,34 ± 0,17 ^{ab}	
	Glutamato sintasa (GOGAT)	0,27 ± 0,01 ^a	0,29 ± 0,00 ^a	0,28 ± 0,00 ^a	0,28 ± 0,01 ^a	
	Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	1,59 ± 0,06 ^a	1,58 ± 0,06 ^a	1,60 ± 0,06 ^a	1,71 ± 0,07 ^a	
	Glutamina sintetasa (GS)	1,84 ± 0,15 ^a	1,19 ± 0,03 ^b	0,22 ± 0,04 ^d	0,52 ± 0,06 ^c	
Raíz	Aspartato aminotransferasa (AAT)	0,98 ± 0,09 ^a	1,70 ± 0,17 ^c	1,37 ± 0,02 ^b	1,29 ± 0,03 ^b	
	Glutamato sintasa (GOGAT)	0,25 ± 0,00 ^a	0,26 ± 0,00 ^b	0,26 ± 0,00 ^b	0,26 ± 0,00 ^b	
	Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)	0,58 ± 0,06 ^a	1,07 ± 0,11 ^b	0,76 ± 0,03 ^a	0,73 ± 0,04 ^a	
	Glutamina sintetasa (GS)	0,23 ± 0,02 ^a	0,43 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,02 ^c	0,11 ± 0,02 ^c	

nd: no detectado

Tabla VII.11. Actividades enzimáticas del metabolismo del C ($\mu\text{mol NAD(P)H g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$) en hojas y raíces de altramus y soja con y sin FBN, cultivadas durante 35 días con 1,6 μM y exceso de Cu. Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). La significación de las medias para dosis de Cu y especie vegetal con y sin FBN se ha establecido a partir del ANOVA ($P < 0,05$)

Órgano	Enzimas	Dosis de Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	48
		Sin FBN		Con FBN	
		Altramuz			
Hojas	Sacarosa sintetasa (SS)	4,09 ± 0,03 ^a	3,56 ± 0,08 ^b	8,06 ± 0,12 ^a	8,68 ± 0,25 ^a
	Malato deshidrogenasa (MDH)	33,5 ± 1,9 ^a	32,3 ± 0,9 ^a	98,0 ± 12,4 ^a	143,6 ± 11,5 ^b
	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	0,78 ± 0,02 ^a	0,76 ± 0,02 ^a	1,00 ± 0,09 ^a	1,47 ± 0,06 ^b
	UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	14,9 ± 0,2 ^a	9,6 ± 0,2 ^b	22,1 ± 0,9 ^a	33,3 ± 2,2 ^b
Raíz	Sacarosa sintetasa (SS)	2,06 ± 0,05 ^a	1,35 ± 0,14 ^b	4,69 ± 0,33 ^a	2,93 ± 0,14 ^b
	Malato deshidrogenasa (MDH)	21,5 ± 0,8 ^a	16,5 ± 0,3 ^b	39,6 ± 1,6 ^a	29,5 ± 1,2 ^b
	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	0,67 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,02 ^b	0,50 ± 0,04 ^a	0,39 ± 0,03 ^b
	UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	7,5 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,5 ^b	10,2 ± 0,4 ^a	6,3 ± 0,4 ^b
		Soja			
Hojas	Sacarosa sintetasa (SS)	3,30 ± 0,05 ^a	3,14 ± 0,07 ^a	5,61 ± 0,25 ^a	6,29 ± 0,03 ^a
	Malato deshidrogenasa (MDH)	136,8 ± 10,8 ^a	157,0 ± 6,7 ^a	135,0 ± 9,0 ^a	183,1 ± 1,2 ^b
	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	1,89 ± 0,03 ^a	2,07 ± 0,08 ^a	1,47 ± 0,06 ^a	0,87 ± 0,02 ^b
	UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	23,6 ± 0,3 ^a	22,7 ± 0,8 ^a	16,0 ± 1,3 ^a	32,0 ± 0,8 ^b
Raíz	Sacarosa sintetasa (SS)	3,85 ± 0,10 ^a	3,55 ± 0,12 ^a	1,62 ± 0,06 ^a	2,69 ± 0,284 ^b
	Malato deshidrogenasa (MDH)	157,1 ± 14,3 ^a	160,6 ± 8,1 ^a	28,8 ± 3,1 ^a	41,4 ± 2,6 ^b
	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	1,40 ± 0,05 ^a	1,29 ± 0,14 ^a	0,30 ± 0,01 ^a	0,57 ± 0,05 ^b
	UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	24,9 ± 0,6 ^a	22,5 ± 1,4 ^a	4,6 ± 0,1 ^a	6,9 ± 0,8 ^b

Tabla VII.12. Actividades enzimáticas del metabolismo del C ($\mu\text{mol NAD(P)H g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$) en las hojas y raíces de plantas noduladas de altramuza y soja cultivadas durante 35 días con dosis crecientes de Cu (1,6-192 μM). Los resultados son las medias \pm el E.T. ($n = 4$). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ($P < 0,05$)

Órgano	Enzimas	Dosis de Cu (μM)			
		1,6	48	96	192
Altramuz					
Hojas	Sacarosa sintetasa (SS)	8,06 ± 0,12 ^a	8,68 ± 0,25 ^{ab}	8,92 ± 0,29 ^{ab}	9,45 ± 0,36 ^b
	Malato deshidrogenasa (MDH)	98,0 ± 4,4 ^a	143,6 ± 11,5 ^b	151,9 ± 8,4 ^b	147,9 ± 11,2 ^b
	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	1,00 ± 0,09 ^a	1,47 ± 0,06 ^b	1,51 ± 0,07 ^b	1,48 ± 0,09 ^b
	UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	22,1 ± 0,9 ^a	33,3 ± 2,2 ^b	34,3 ± 2,0 ^b	29,6 ± 1,7 ^b
Raíz	Sacarosa sintetasa (SS)	4,69 ± 0,33 ^a	2,93 ± 0,14 ^b	3,24 ± 0,16 ^b	5,45 ± 0,53 ^a
	Malato deshidrogenasa (MDH)	39,6 ± 1,6 ^a	29,5 ± 1,2 ^b	32,0 ± 2,4 ^b	44,3 ± 1,7 ^a
	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	0,50 ± 0,04 ^{ab}	0,39 ± 0,03 ^c	0,42 ± 0,02 ^{cd}	0,53 ± 0,03 ^a
	UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	10,2 ± 0,4 ^a	6,3 ± 0,4 ^b	7,2 ± 0,4 ^b	14,8 ± 0,2 ^c
Soja					
Hojas	Sacarosa sintetasa (SS)	5,61 ± 0,25 ^a	6,29 ± 0,03 ^a	5,92 ± 0,13 ^a	6,38 ± 0,39 ^a
	Malato deshidrogenasa (MDH)	135,0 ± 9,0 ^a	183,1 ± 1,2 ^b	180,6 ± 9,48 ^b	181,4 ± 10,8 ^b
	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	1,47 ± 0,06 ^a	0,87 ± 0,02 ^c	0,76 ± 0,03 ^c	1,13 ± 0,01 ^b
	UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	16,0 ± 1,3 ^a	23,5 ± 0,8 ^b	21,5 ± 0,4 ^b	23,0 ± 0,3 ^b
Raíz	Sacarosa sintetasa (SS)	1,62 ± 0,06 ^a	2,69 ± 0,28 ^b	1,80 ± 0,05 ^a	1,91 ± 0,05 ^a
	Malato deshidrogenasa (MDH)	28,8 ± 3,1 ^a	41,4 ± 2,6 ^b	28,7 ± 0,8 ^a	32,4 ± 1,7 ^a
	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	0,30 ± 0,01 ^a	0,57 ± 0,05 ^b	0,59 ± 0,05 ^b	0,51 ± 0,02 ^b
	UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa)	4,61 ± 0,11 ^a	6,92 ± 0,82 ^b	4,04 ± 0,14 ^a	4,22 ± 0,11 ^a

Tabla VII. 13. Contenido de MDA y -SH (nmol g⁻¹ MF) en hojas y raíces de plantas de altramuzy soja con y sin FBN, cultivadas durante 35 días con 1,6 µM y exceso de Cu. Los resultados son las medias (±) el E.T. (n = 4). La significación de las medias para dosis de Cu y especie vegetal con y sin FBN se ha establecido a partir del ANOVA (P < 0,05)

Órgano		Dosis de Cu (μM)			
		1,6	24	1,6	48
		Sin FBN		Con FBN	
Altramuz					
Hojas	MDA	31,45 ± 0,16 ^a	60,94 ± 1,05 ^b	13,66 ± 1,50 ^a	20,54 ± 0,28 ^b
	-SH	581,65 ± 6,32 ^a	727,63 ± 6,91 ^b	473,85 ± 18,52 ^a	543,88 ± 1,47 ^b
Raíz	MDA	37,96 ± 1,09 ^a	65,34 ± 0,79 ^b	21,38 ± 0,45 ^a	23,93 ± 1,08 ^a
	-SH	97,61 ± 3,92 ^a	158,92 ± 2,85 ^b	94,72 ± 6,29 ^a	63,31 ± 10,31 ^b
Soja					
Hojas	MDA	46,45 ± 1,03 ^a	62,84 ± 0,58 ^b	31,50 ± 3,32 ^a	84,65 ± 3,69 ^b
	-SH	728,24 ± 2,39 ^a	860,22 ± 12,14 ^b	620,22 ± 19,63 ^a	700,04 ± 46,00 ^a
Raíz	MDA	38,54 ± 0,82 ^a	41,77 ± 0,93 ^b	24,66 ± 0,73 ^a	56,40 ± 3,59 ^b
	-SH	239,5 ± 7,07 ^a	227,33 ± 3,56 ^a	118,08 ± 4,08 ^a	114,45 ± 2,50 ^a

Tabla VII. 14. Contenido de MDA y -SH (nmol g⁻¹ MF) en hojas y raíces de plantas noduladas de altramuzy soja cultivadas durante 35 días con dosis crecientes de Cu (1,6-192 µM). Los resultados son las medias ± el E.T. (n = 4). Medias dentro de una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan (P < 0,05)

Órgano	Elementos	Dosis de Cu (μM)			
		1,6	48	96	192
Altramuz					
Hojas	MDA	13,7 ± 1,5 ^a	20,5 ± 0,3 ^b	26,1 ± 0,6 ^c	29,8 ± 1,3 ^d
	-SH	473,9 ± 18,5 ^a	543,9 ± 1,5 ^b	537,0 ± 23,7 ^b	511,2 ± 24,5 ^{ab}
Raíz	MDA	21,4 ± 0,5 ^a	23,9 ± 1,1 ^a	38,4 ± 0,7 ^b	48,2 ± 4,0 ^c
	-SH	94,7 ± 6,3 ^{ab}	63,3 ± 10,3 ^a	95,2 ± 6,5 ^{ab}	157,4 ± 8,8 ^c
Soja					
Hojas	MDA	31,5 ± 3,3 ^a	84,7 ± 3,7 ^b	91,8 ± 2,1 ^b	91,3 ± 3,5 ^b
	-SH	620,2 ± 19,6 ^a	700,0 ± 46,0 ^{ab}	821,0 ± 57,1 ^{bc}	963,8 ± 80,7 ^c
Raíz	MDA	24,7 ± 0,7 ^a	56,4 ± 3,6 ^b	58,4 ± 0,9 ^b	52,7 ± 1,8 ^b
	-SH	118,1 ± 4,1 ^a	114,5 ± 2,5 ^a	197,9 ± 14,7 ^b	236,6 ± 17,0 ^c

